

Contribution à l'Étude
de la
Multiplication et des Formes d'Involution
des Cocci Pyogènes

THÈSE
POUR L'OBTENTION DU DIPLOME
DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(PHARMACIE)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE LE 1936

PAR
DENISE BLANCHARD
PHARMACIEN DE PREMIÈRE CLASSE

Jury { MM. LUTZ, président.
BACH, professeur.
BEDEL, agrégé.

CHARTRES
IMPRIMERIE DURAND
RUE FULBERT

1936

Thèse pour le Doctorat de l'Université de Paris
(Pharmacie)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552420_0036

Contribution à l'Étude
de la
Multiplication et des Formes d'Involution
des Cocci Pyogènes

THÈSE
POUR L'OBTENTION DU DIPLOME
DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(PHARMACIE)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE LE 1936

PAR

DENISE BLANCHARD

PHARMACIEN DE PREMIÈRE CLASSE

Jury { MM. LUTZ, président.
BACH, professeur.
BEDEL, agrégé.

CHARTRES
IMPRIMERIE DURAND

RUE FULBERT

1936

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. GUÉRIN, Doyen, O. *, $\odot$ I.
P. LEBEAU, Assesseur, O. *, $\odot$ I.
P. DESPORT, Secrétaire, *, $\odot$ I.

PROFESSEURS

MM. GUÉRIN, O. *, $\odot$ I. Botanique générale.
PERROT, C. *, $\odot$ I. Histoire naturelle des médicaments.
COUTIÈRE, O. *, $\odot$ I. Zoologie.
LEBEAU, O. *, $\odot$ I. Pharmacie chimique.
BOUGAULT, O. *, $\odot$ I. Chimie analytique.
GORIS, O. *, $\odot$ I. Pharmacie galénique.
TASSILLY, O. *, $\odot$ I. Physique.
DAMIENS, *, $\odot$ I. Chimie minérale.
HÉRISSEY, O. *, $\odot$ I. Chimie biologique.
SOMMELET, *, $\odot$ I. Chimie organique.
LUTZ, *, $\odot$ I. Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, *, $\odot$ I. Toxicologie.
LAUNOY, O. *, $\odot$ I. Professeur sans chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. *, $\odot$ I.

Professeurs honoraires : MM. BÉHAL, G. O. *, $\odot$ I.,
DELÉPINE, O. *, $\odot$ I.,
Membres de l'Institut ;
M. GUERBET, *, $\odot$ I.

CHARGÉS DE COURS

MM. Marc HONNORAT, *, $\odot$ I. Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LAUNOY, O. *, $\odot$ I. Pharmacodynamie.
DELABY, *, $\odot$ I. Hydrologie et Hygiène.
PICON, $\odot$ I. Chimie minérale.
BACH, $\odot$ I. Microbiologie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. DELABY, *, $\odot$ A.	MM. MASCRÉ, $\odot$ I.	MM. BEDEL, $\odot$ I.
PICON, $\odot$ I.	FLEURY, $\odot$ I.	RÉGNIER, $\odot$ I.
	BACH, $\odot$ I.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, $\odot$ I., agrégé, chargé des T.P. de 1^{re} année. Chimie générale.
FLEURY, $\odot$ I., et RÉGNIER, $\odot$ I., agrégés, chargés des travaux de. Chimie analytique.
SOUÈGES, $\odot$ I. Micrographie.
LEROUX, *, $\odot$ I. Physique.
DEVAL, *, $\odot$ I. Microbiologie.
DELABY, *, $\odot$ I., PICON, $\odot$ I., et MASCRÉ, $\odot$ I. :
agrégés, chargés des travaux généraux de 4^e année.

Bibliothécaire en chef : M. BERNARD, $\odot$ I.



A MONSIEUR LE PROFESSEUR LUTZ,
Chevalier de la Légion d'Honneur,

*auquel nous adressons l'expression de notre
respectueuse gratitude pour l'intérêt qu'il
a bien voulu porter à nos travaux.*

A MES PARENTS.

A MES FRÈRES.

MEIS ET AMICIS

INTRODUCTION

La température exerce une influence considérable sur la multiplication microbienne. De nombreux auteurs parmi lesquels HEHEWERTH (54), WHIPPLE (98), OTTO RAHN (82), JANET E. LANE CLAYTON (24), H. CHICK (21) et PENFOLD (79-80), ont décrit de façon très intéressante son action aux diverses phases de la croissance.

Malheureusement, faute d'appareils suffisants, beaucoup de ces travaux manquaient de précision. Aussi a-t-il paru intéressant de reprendre ces études.

Grâce à un appareil sensible au dixième de degré, il a été possible de suivre la multiplication degré par degré.

Ayant observé au cours de ces travaux des modifications morphologiques du Staphylocoque, nous avons étudié différentes causes pouvant provoquer l'apparition de formes d'involution avec le Staphylocoque et avec le Streptocoque.

Au début de ce travail nous tenons à exprimer notre

profonde gratitude à Monsieur le professeur LUTZ, pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à cette étude et pour la grande bienveillance qu'il nous a toujours témoignée.

Que Messieurs les professeurs BACH et BEDEL, qui ont accepté de faire partie de notre jury de thèse, veuillent bien agréer nos remerciements.

Nous sommes particulièrement reconnaissante à Monsieur CHARTIER, assistant du Cours de Cryptogamie à la Faculté de Pharmacie, pour les conseils éclairés dont il a bien voulu nous faire profiter et à Monsieur GESTEAU, assistant du Cours de Physique, à la complaisance duquel nous devons l'appareil qui nous a servi au cours de notre étude.

PLAN DU TRAVAIL

Dans le *premier chapitre*, nous rappellerons les travaux bibliographiques se rapportant à la multiplication microbienne et à la numération.

Dans le *deuxième chapitre*, nous décrirons l'appareil utilisé, nous indiquerons la composition du milieu, et la méthode de numération employée et nous donnerons les résultats obtenus en cultivant du Staphylocoque de 25 à 45°.

Dans le *troisième chapitre*, nous relaterons les travaux se rapportant au polymorphisme microbien et nous décrirons les formes d'involution obtenues avec le Staphylocoque et avec le Streptocoque sous l'influence de diverses causes dysgénésiques.

CHAPITRE PREMIER

DIFFÉRENTES ÉTUDES SUR LA MULTIPLICATION MICROBIENNE

Le développement des bactéries offre un intérêt de tout premier ordre pour le bactériologiste. Les conditions qui influent sur la multiplication microbienne sont excessivement nombreuses. L'espèce microbienne, l'âge de la culture, sa virulence, la température, la nature et la composition du milieu de culture, son pH , le nombre de microbesensemencés, sont parmi les principales causes qui agissent sur le développement.

Les premiers essais furent entrepris dans les années 1885, 1886, 1887.

En 1885 CRAMER (27) et en 1886 LEONE (69) étudièrent, le premier, les variations du nombre microbien dans les eaux du lac de Zürich, et le second, celles d'une eau des environs de Munich. Tous deux constatèrent que le nombre de microbes s'accroît d'abord progressivement, puis diminue moins vite qu'il n'avait augmenté.

En 1887 MIQUEL (73-74) fit les mêmes constatations sur les eaux de la Vanne et de la Dhuis mises en bouteilles à la température de 29° à 30°.

En 1895 FULLER (40), dans des essais analogues, remarqua qu'une eau d'étang qui au moment du prélèvement renfermait 1 190 000 bactéries par centimètre cube n'en contenait plus que 1 085 000 après 2 heures. Au bout de 24 heures le nombre s'élevait à 23 000 000 ; et, au bout de 8 jours, retombait à 2 341 000. Ces résultats furent confirmés par WHIPPLE (98), 1901 ; et FOKKER (37), 1890, dans une étude des bactéries du lait, avait déjà fait des observations semblables.

En 1887, BUCHNER, LONGARD et RIEDLIN (16) étudièrent la multiplication du *Vibrio Choléræ* en bouillon nutritif par la numération en plaques de gélatine, afin de se rendre compte de la propagation de l'infection. Ils furent les premiers à agir de façon méthodique et dans le but précis d'étudier la multiplication. Ils déterminèrent les conditions favorables pour suivre le développement.

Ils utilisèrent un milieu de culture approprié, choisirent 37° comme température, et prirent une culture pure et vigoureuse. Ils déterminèrent aussi exactement que possible le nombre de microbes par centimètre cube au début et à la fin de l'expérience et notèrent exactement sa durée. Ils utilisèrent des bouillons ne renfermant au début que quelques centaines de microbes par centimètre cube, et le temps de leurs expériences ne dura pas plus de 2 à 5 heures, afin d'éviter l'accumulation des produits nuisibles dus au métabolisme microbien.

Ils établirent que les microbes se divisent par 2 et ainsi de suite.

Par suite, si a est le nombre de microbes, nous avons :

Après 1 bipartition	$a \times 2$	microbes
— 2 —	$a \times 2 \times 2$	—
— 3 —	$a \times 2 \times 2 \times 2$	—
— x —	$a \times 2^x$	—

Si nous appelons b ce nombre de microbes après x bipartitions nous avons :

$$a \times 2^x = b$$

ou
$$2^x = \frac{b}{a}$$

ou
$$x = \frac{\log b - \log a}{\log 2}.$$

Si T est le temps pendant lequel se sont produites ces x bipartitions, y le temps moyen d'une bipartition ou temps de génération sera :

$$y = \frac{T}{x}.$$

En 1895 MAX MULLER (76) rechercha l'influence des températures fébriles sur la multiplication des bactéries pathogènes. Il employa la méthode des plaques de gélose avec le Bacille Typhique et ne fit pas ses numérations uniquement au début et à la fin de l'expérience, mais toutes les 3 heures.

Il constata ainsi que pendant les 3 premières heures le développement est très lent. Il recommença alors ses expériences avec des cultures de plus en plus jeunes : 3 heures, 2 heures trois quarts, 2 heures et demie et il vit que, pour des cultures très jeunes, la latence n'existait plus.

MULLER distingua 3 stades en partant de cultures vieilles de 1 à 2 jours.

1° Une période d'arrêt pouvant durer de 3 à 4 heures.

2° Une période de développement logarithmique.

3° Une période de développement ralenti qui finit par s'arrêter.

Il constata que les températures fébriles ne parvenaient pas à arrêter la croissance du Bacille Typhique, qu'il fallait atteindre 44°,5 pour obtenir ce résultat.

Les travaux de BUCHNER et de ses élèves et de MULLER renferment les théories essentielles sur le développement microbien. Les auteurs qui suivront n'apporteront que des détails complémentaires.

Les diverses phases de la poussée microbienne ont été étudiées par GOTSCHLICH (48), WEIGANG (48), HEHEWERTH (54), JANET E. LANE CLAYPON (24), MISS H. CHICK (21), PENFOLD (79), ALAN M. CHESNEY (20), CLARK RUEHL (23), GRAHAM SMITH (33), BUCHANAN (12, 13, 14, 15), WINSLOW (100), M^{me} KAPLAN (69), R. DAVID (28).

Nous pouvons distinguer 5 phases :

1° Phase de latence ;

2° Phase de multiplication logarithmique ;

3° Phase de multiplication ralentie ;

4° Phase de maximum stationnaire ;

5° Phase de destruction des bactéries.

PHASE DE LATENCE

Cette phase a été mise en évidence par MULLER (76) et FULLER (40) en 1895. Elle fut confirmée par HEHEWERTH

en 1901, qui montra que la période de latence varie avec l'âge de la culture, avec l'espèce microbienne, la température d'incubation ; et qu'elle est plus prolongée dans le cas de cultures vieilles et à basse température ; qu'elle diminue quand les repiquages sont faits dans un milieu auquel l'espèce microbienne est habituée.

OTTO RAHN (82) en 1906 confirma les travaux de MULLER et HEHEWERTH (54) sur la phase de latence ; et il montra en plus que la phase de latence diminue quand on part d'un ensemencement plus important.

Il émit la théorie de l'apport diastasique.

Les bactéries apporteraient des diastases nécessaires à l'assimilation de la substance nutritive, ou des substances toxiques qui accéléreraient la poussée microbienne ; ou alors les bactéries agiraient elles-mêmes sur la phase de latence par l'apport d'endoenzymes. Il admit que la phase de latence n'est vaincue que par l'apport d'une quantité suffisante de substances favorables, ce qui expliquerait que cette phase est plus courte quand l'ensemencement est plus important.

En 1908, BARBER (4) étudia la multiplication microbienne en partant d'une bactérie unique ; il partit d'une bactérie très jeune ensemencée dans « une goutte pendante » de bouillon et il fit une numération directe. Il ne trouva pas de phase de latence ni pour le *B. Coli*, ni pour le *B. Typhi* ni pour le *Subtilis*.

Pour expliquer la différence de résultats obtenue, par lui et par les autres auteurs, il admit que le temps de latence représentait le temps que mettaient les bactéries âgées à se développer, temps qui n'existait pas pour les bactéries jeunes.

En 1909 JANET E. LANE CLAYPON (24) montra l'influence de la température sur la phase de latence, cette période pouvant atteindre de 1 à 6 heures suivant les variations de la température.

En 1910 MYER COPLANS (26) étudia l'influence du milieu sur la phase de latence. Il employa deux milieux ; de l'eau peptonée salée et du bouillon dulcité. Il constata que la période de latence existait avec les deux milieux, mais qu'avec le bouillon dulcité, il y avait au début une baisse dans le nombre. Il fit ses numérations par la méthode des plaques. Il conclua que de cultiver les bactéries dans un milieu autre que celui auquel elles sont habituées diminuait leur vitalité.

Il remarqua d'autre part que la latence était plus grande quand les cultures mères étaient plus âgées ou qu'elles avaient été portées auparavant à basse température ou additionnées d'antiseptiques comme le borate de soude.

En 1911 MAC KENDRICK et PAÏ (54) utilisèrent des souches très jeunes, de 1 à 3 heures, et constatèrent que l'on pouvait éliminer la phase de latence.

En 1914 PENFOLD (79) fit une étude approfondie sur la période de latence : il montra que, si une culture en plein développement est arrêtée par le froid, sa croissance reprend ensuite sans période de latence. Il trouva aussi que, pour des cultures repiquées pendant la phase de croissance, logarithmique, la latence n'existait plus. Il constata, conformément à LANE CLAYPON et H. CHICK, que la latence est plus longue quand la température est plus basse et, conformément à Muller, à Rahn et à Coplans, que la latence est plus longue quand les bactéries sont plus âgées. Il admit

que, parmi les bactéries ensemencées, les individus avaient des possibilités de croissance différentes et qu'il se produisait une sélection. Il admit aussi que le protoplasme bactérien synthétisait certains constituants grâce à des enzymes ; et que la croissance la plus rapide se produisait quand la concentration de ces substances était optima.

En 1916 ALAN M. CHESNEY (20) étudie, par cultures sur plaques de gélose, la poussée sur bouillon du Pneumocoque, du Colibacille, du *B. Prodigiosus* et du *B. Fluorescens Liquefaciens* et retrouve les mêmes résultats.

BUCHANAN (12) en 1918 divise la phase de latence en deux parties : une période initiale stationnaire et une deuxième période où le développement a une accélération positive.

En 1931 R. DAVID (28) observa la multiplication du Bacille Pyocyanique sur différents milieux de culture liquides. Il fit cette étude en effectuant deux numérations comparées. Il employa la méthode des plaques de gélose, et la numération microscopique indirecte à l'aide des levures. Il montra que la période de latence ne se retrouvait que dans la première méthode (c'est cette méthode en effet qui servait exclusivement à tous les auteurs qui ont montré l'existence de la période de latence) ; mais que cette phase de latence n'existait pas quand on employait la seconde numération. On observe alors une phase de multiplication ralentie pendant les 2 ou 3 premières heures ; et ensuite, on obtient une multiplication accélérée. Le temps de génération, très long au début, diminue pour atteindre un temps minimum qui correspond à la phase de développement logarithmique. Cette étude confirme les résultats donnés par J. REGNIER et S. LAMBIN (85) en 1927.

Il semble donc que si la latence n'existe pas, pendant les premières heures de culture, il ne se développe cependant à cette période que des organismes de vitalité faible, puisqu'ils ne se reproduisent pas par les plaques de gélose et ne sont capables de se développer que dans leur milieu.

PHASE LOGARITHMIQUE.

C'est la phase pendant laquelle le développement est rapide. Les microbes pendant cette période se développent en progression géométrique. De nombreux auteurs l'ont étudiée.

En 1901 HEHEWERTH (54) montra que dans une culture le nombre total de bactéries est toujours plus grand que le nombre de bactéries vivantes. Cette différence entre les deux nombres va en augmentant et devient considérable au bout de plusieurs jours de culture.

Il trouva que la rapidité de croissance dans les mêmes conditions de température et de milieu variait avec l'espèce microbienne. Il constata que le Bacille Coli se développait plus vite que le Bacille Typhique.

En 1908 BARBER (4) étudia l'influence des milieux de culture sur la croissance du Colibacille. Il essaya successivement de supprimer le sel, d'ajouter du sucre, d'ajouter de l'albumine humaine (sérum sanguin, extrait de muscle). Il n'obtint aucun résultat appréciable.

Il fit varier la température et constata que le développement était sensiblement nul à 10°, qu'il augmentait jusqu'à 37°, où il était optimum ; qu'il se maintenait jusqu'à 46° ; et qu'il s'arrêtait presque complètement au delà de 50°.

En 1909 JANET E. LANE CLAYPON (24) étudia l'influence de la température sur le temps de génération et trouva comme BARBER (4) que ce temps diminuait de 20° à 42° ; augmentait au dessus de 42°, et devenait presque nul au delà de 50°.

Entre 20° et 35° l'effet de la température est régulier ; chaque augmentation d'un degré produit une même augmentation de la valeur de croissance. Au delà de 35°, les résultats sont moins nets. Les mêmes observations avaient déjà été faites par BARBER :

JANET E. LANE CLAYPON en déduisit que l'augmentation de la valeur de la croissance par la température était en accord avec la loi de Arrhenius-Van't Hoff.

Il constata que la période de la phase logarithmique était d'autant plus brève que la température était plus élevée. Dans le cas du Colibacille et du *Bacillus Enteridis*, la multiplication géométrique se prolonge :

7 heures et demie à 37°,	
8 heures et demie à 30°,	
15 heures	à 25°,
et 24 heures	à 20°.

En 1912 MISS H. CHICK (21) étudia l'influence des températures élevées telles qu'elles se produisent dans les maladies fébriles. Elle fit ses essais, dans le sérum sanguin de lapin pour le Bacille Coli, et dans le sérum sanguin de lièvre pour le Bacille Typhique. Elle partait de cultures de 24 heures maintenues à 37°. Elle les plaçait dans des thermostats réglés à 20°, 30° et 40°.

MISS H. CHICK constata que la période logarithmique

était d'autant plus courte que la température était plus élevée et que le temps de génération diminuait quand la température s'élevait.

En 1919 BARNETT, COHEN et MANSFIELD CLARK (25) étudièrent par des numérations nombreuses l'influence du pH sur la phase logarithmique. Ils firent des essais avec du Bacille Coli. Ils constatèrent qu'avec ce bacille, la vitesse de multiplication est sensiblement la même quand le pH reste compris entre pH 5 et pH 8. Le temps de génération augmente lentement quand le pH monte au delà de pH 8, et augmente beaucoup plus rapidement quand le pH descend au-dessous de pH 5.

Ces auteurs constatèrent aussi que la concentration en ions hydrogène n'est pas seule à agir. Au point de vue pH acide, ils remarquèrent que la nature de l'acide avait son influence. L'acide acétique est plus toxique que l'acide chlorhydrique.

En 1920, GRAHAM SMITH (93) fit des essais à partir du premier jour de la culture jusqu'à ce qu'elle ait atteint son chiffre maximum. Ces études se placent donc pendant la période logarithmique.

En ensemençant un petit nombre de Staphylocoques Dorés, dans un bouillon renfermant un extrait de viande sans sel ni peptone à la température de 37°, la multiplication est plus rapide le premier jour et plus lente ensuite ; elle atteint un maximum, qui est d'environ 1 milliard par centimètre cube. Le degré de multiplication semble être en relation avec la quantité d'extrait de viande existant dans la culture.

Lorsqu'on repique plusieurs fois dans un même milieu

une culture dans un temps court, la multiplication est accélérée.

Lorsque l'onensemence un grand nombre de cocci, la multiplication est lente pendant 2 jours. Lorsque les nombres de cocci ensemencés sont différents et faibles, les résultats sont sensiblement les mêmes au bout de 24 heures.

La température d'incubation a une grosse influence sur la poussée microbienne.

A 37° la multiplication est très rapide pendant 24 heures. Le maximum est atteint le 2^e ou le 3^e jour.

A 27° le maximum est atteint le 5^e ou le 6^e jour ; il est plus grand qu'à 37°.

A 17° la multiplication est très lente pendant 48 heures, devient ensuite plus rapide et le maximum, plus haut qu'à 27°, est atteint le 8^e jour.

A 8° il y a une légère multiplication le premier jour.

Aux températures inférieures, la multiplication ne se produit pas, les nombres tombent rapidement et les cultures meurent.

En 1922 WILSON (99) a étudié la multiplication microbienne par deux méthodes.

1° Numération directe au microscope de la totalité des micro-organismes.

2° Numération des microbes (viables) par ensemencement sur gélose.

Il constate que, généralement, le nombre de bactéries viables n'atteint pas le nombre de bactéries totales et que ce rapport à la fin de la période logarithmique est généralement de 65 pour 100.

En 1931 M^{me} KAPLAN (63) en étudiant l'influence du nombre ensemencé sur la multiplication microbienne, montra que la multiplication logarithmique existe toujours quel que soit le nombre de microbes ensemencés mais qu'elle est plus lente quand ce nombre est plus considérable.

La même année R. DAVID (28) étudia la multiplication du Bacille Pyocyanique dans les milieux de culture liquide. Il constata que la multiplication du Bacille Pyocyanique s'effectue sensiblement de la même façon dans les différents milieux naturels.

La phase logarithmique a une durée de 2 heures et demie à 6 heures pour les bacilles vivants.

PHASE DE MULTIPLICATION RALENTIE

Pendant cette phase, la multiplication se ralentit peu à peu, le nombre de bactéries grandit, mais de plus en plus lentement. Le temps de génération augmente de plus en plus et tend vers l'infini. Cette phase a été mise en évidence par J. E. LANE CLAYPON (24), MISS H. CHICK (21), ALAN M. CHESNEY (20) et GRAHAM SMITH (33). Elle dure de 12 à 24 heures après la phase logarithmique.

C'est la phase dans laquelle on se place quand on commence une culture avec une souche âgée de 24 heures. Elle a été très peu étudiée.

PHASE DE MAXIMUM STATIONNAIRE

Cette phase, comme la précédente, a été peu étudiée. Sa durée n'a pas été bien déterminée. JANET E. LANE

CLAYPON (24) a trouvé qu'elle pouvait se prolonger 2 à 4 jours suivant la température.

GRAHAM SMITH (93), comme on l'a montré précédemment, établit que le maximum dépend de la température d'incubation et du nombre de bactériesensemencées.

PHASE DE DESTRUCTION DES BACTÉRIES

Le nombre de bactéries après avoir atteint un maximum, décroît. Cette phase a été étudiée par quelques auteurs. GOTSCHLICH et WEIGANG (48) admettent que la diminution des bactéries varie avec le vieillissement. Ils firent leurs essais avec le *Vibron Cholérique* et ils montrèrent l'influence de la température dans cette phase. Le nombre de bactéries d'une culture poussée à 37° et laissée ensuite à cette température diminue rapidement. Au bout de deux jours, il ne reste plus que 10 pour 100 d'individus vivants ; et au bout de 3 jours 1 pour 100. Si on conserve à basse température une souche de 20 heures cultivée à 37°, on observe que la diminution des microbes capables de se reproduire sur gélatine est beaucoup plus lente. Après 9 jours il reste encore 10 pour 100 d'individus (vivants).

En 1904, EYKMAN (36) essaya de donner les raisons de l'arrêt de la poussée microbienne. Deux hypothèses se présentèrent à son esprit. L'arrêt se produisait par épuisement du milieu ou bien par une accumulation de substances empêchantes. A la suite d'essais faits sur des cultures en période de destruction, il conclut que l'arrêt de la multiplication provenait non pas de l'épuisement des matières

nutritives, mais de la présence de matières inhibitrices, thermolabiles, non filtrables, et pourtant diffusibles.

En 1916 ALAN M. CHESNEY (20) étudia par culture sur plaques de gélose la poussée en bouillon du Pneumocoque, du Colibacille, du Prodigiosus, et du *Bacillus Fluorescens Liquefaciens*. Il remarqua que les substances responsables de l'arrêt de la poussée microbienne exercent une action inhibitrice très marquée au moment du maximum de croissance et que cette action inhibitrice diminue quand la culture vieillit.

En 1918 BUCHANAN (12) étudia la phase de destruction rapide des bactéries et admit que cette destruction se produisait géométriquement. La courbe des logarithmes des nombres en fonction des temps est représentée par une droite.

En 1920, GRAHAM SMITH (93) étudia la phase de destruction. Il montra que le nombre d'organismes vivants décroît d'abord rapidement, puis ensuite, plus lentement jusqu'à ce qu'il atteigne un niveau assez bas qu'il conserve assez longtemps. Pendant cette période assez constante on observe de faibles oscillations du nombre.

GRAHAM SMITH montre que si on ajoute de l'extrait de viande au moment de la destruction, il se déclenche une nouvelle multiplication sensiblement proportionnelle à la quantité de substance nutritive ajoutée. Par de faibles, mais régulières additions de substances nutritives une concentration définie de Staphylocoques peut être maintenue pendant une longue période.

En 1924, J. EFFRONT (35) constatant qu'on ne pouvait expliquer l'arrêt de multiplication par l'absence d'éléments

nutritifs ou par l'accumulation de substances inhibitrices, admet que cet arrêt provient d'une modification dans la répartition des éléments nutritifs.

Les facteurs qui agissent sur le développement microbien sont nombreux et nous voyons que pour certains il est difficile de déterminer leur influence précise.

Résumons ce qui a été vu par les différents auteurs.

L'espèce microbienne est un facteur important dans le développement. Les résultats sont différents suivant les races utilisées; le temps de génération varie de l'une à l'autre dans les mêmes conditions d'expérimentation.

L'âge de la culture influe surtout sur la période de latence qui diminue quand les souches sont jeunes. Des repiquages répétés activent le développement. Quand on ensemente un grand nombre de bactéries, d'après certains auteurs, la phase de latence diminue; et comme l'a montré M^{me} Kaplan, le temps de génération augmente pendant la période logarithmique. Le milieu est une cause essentielle de la multiplication microbienne. Cependant les variations de sa composition ne donnent pas toujours des effets sensibles sur le rythme de la multiplication. L'accoutumance à un milieu déterminé facilite la croissance; les repiquages sur le milieu habituel diminuent la phase de latence; et pendant cette phase les bactéries poussent dans le milieu où elles se trouvent mais ne peuvent se reproduire sur un milieu différent, en gélose ou en gélatine par exemple.

La réaction du milieu a aussi son importance. Le pH trop acide ou trop alcalin agit sur toutes les périodes de la croissance en produisant un retard dans le développement et en augmentant le temps de génération.

La température a une grosse influence sur la multiplication microbienne. Son action se fait sentir durant toutes les phases. Il existe une température optima pour chaque espèce, pour laquelle le temps de génération est minimum. Au-dessous et au-dessus de cette température il augmente et pour des températures très basses ou très élevées, il tend vers l'infini. La température exerce aussi son influence sur le maximum de bactéries d'une culture ; et la température qui donne le maximum de bactéries n'est pas identique à celle qui donne le temps de génération minimum : elle est plus basse. La température exerce aussi son influence sur la phase de destruction. Les bactéries meurent plus vite à la température optima qu'aux températures plus basses.

TECHNIQUES UTILISÉES POUR L'ÉTUDE QUANTITATIVE DE LA POUSSÉE MICROBIENNE

Dès le début des études bactériologiques, PASTEUR et KOCH cherchent à déterminer le nombre de microbes contenus dans une culture donnée. Par la suite, beaucoup d'auteurs s'intéressent à cette question ; mais comme de nombreuses difficultés techniques se sont présentées, on a essayé de créer de nouvelles méthodes ou de perfectionner celles existantes.

On peut d'après leur principe diviser ces méthodes en trois groupes : celles dénombrant la totalité des microbes,

celles qui ne déterminent que les germes vivants ; enfin celles basées sur l'activité biochimique des bactéries.

MÉTHODES DONNANT LE NOMBRE TOTAL DE MICROBES.

Mesure du volume des masses microbiennes.

PAINE (78), en 1911, CARLSON (19), en 1913, SLATOR (9), en 1921 utilisent cette méthode. On centrifuge les cultures dans des tubes gradués pendant 15 minutes à l'aide d'un appareil faisant 7 000 tours à la minute. Du volume du culot obtenu on déduit le nombre de bactéries.

Mesure du poids de la masse microbienne.

Ce procédé se rapproche du précédent ; mais au lieu de mesurer le volume du culot microbien après la centrifugation, on le pèse.

SABOURAUD (88) utilise cette méthode pour le titrage des vaccins à Staphylocoques. Il estime dans ce cas que 1 milligramme correspond à 500 millions de cocci. FRED VLÈS (97) remplace les lavages à l'eau distillée par des lavages au sérum physiologique, afin d'éviter la bactériolyse.

Évaluation du trouble produit par la masse microbienne.

Beaucoup de bactériologistes ont cherché à utiliser cette propriété pour déterminer le nombre de microbes. BOLAND (6), 1902, DAVISON (29), 1916, HARVEY (50), 1919, GATES (43-44), 1920, DREYER DUNCAN et GARDNER (133), 1918,

DERUBY et AVERY (30), 1918, AVERY GLENN et CULLEN (2), 1918, PORCELLI-TITANE (81) et GOSIO (47), 1917, LÉOPOLD ROBERT (87), 1921, HANS HECKSCHER (52), 1921, ont proposé des techniques s'appuyant sur cette propriété.

C'est FRED VLÈS qui a proposé la méthode la plus précise et la plus scientifique.

Il étudia cette question pour préparer pendant la guerre au Val de Grâce, le sérum antityphique de Vincent. Au début, il employa un opacimètre à polarisation; en 1917 un opacimètre à écran progressif, ces appareils étant gradués par numération directe en nombre de Bacilles Typhiques par centimètre cube. Il obtint les meilleurs résultats avec de la lumière monochromatique rouge.

Ces méthodes donnent des résultats suffisants pour les vaccins, mais ne sont pas d'une exactitude rigoureuse. Pour le poids ou le volume du culot microbien, il y a une adsorption qu'on ne peut déterminer; et pour l'opacimétrie il y a un trouble variable avec l'activité des bactéries et qu'on ne peut estimer.

*Évaluation de la quantité de colorant absorbée
par les organismes microbiens.*

JELIKOW (105), en 1906, propose d'estimer le nombre de bactéries contenues dans une émulsion en déterminant la quantité de fuschine absorbée par ces organismes. On mesure la concentration du colorant avant et après absorption à l'aide du colorimètre de Dubosq. Les résultats ne peuvent être précis, car l'absorption est variable avec l'âge et l'état de la culture.

Numération microscopique des éléments microbiens.

KLEIN (66-67), en 1900, fait la numération directe des bactéries. Il les colore humides, les fixe et les sèche.

Voici sa technique. Il place dans un verre de montre une quantité connue d'émulsion et une quantité égale de violet de gentiane en solution aqueuse anilinée. Après avoir mélangé les 2 liquides et les avoir laissés en contact 2 à 3 minutes, l'émulsion est colorée. On en prélève alors une anse de platine, on étale uniformément sur une lamelle et on fait sécher. On examine un certain nombre de champs. Connaissant l'anse de platine, la surface de la lamelle et celle du champ microscopique, on détermine le nombre de microbes par centimètre cube.

HEHEWERTH (54), en 1901, apporte quelques modifications à cette technique. Il donne des indications sur l'étalement et la coloration et diminue la durée de la dessiccation.

EYKMAN (39), 1904, THANI et THAYSEN (94), 1915, ajoutent de la gélatine à l'émulsion afin d'obtenir une meilleure répartition.

En 1916 ALEX KLEIN (66) modifie quelque peu cette technique. L'émulsion microbienne subit une agitation de plusieurs heures grâce à un appareil électrique; elle est ensuite colorée 5 minutes au violet de méthyle, d'abord à la température du laboratoire, ensuite au bain-marie à 37°, et on y ajoute de la gélatine liquéfiée que l'on mélange. On inclut dans du baume du Canada. On fait la numération d'une centaine de champs. Connaissant la valeur de l'anse de platine, la surface du champ, celle de la lamelle,

on déduit le nombre de microbes par centimètre cube.

HANS HECKSCHER (51-53) en 1921 remplace l'anse de platine jaugée par une pipette compte-gouttes à graduation capillaire.

HENRIQUE (61), 1923, perfectionne le procédé en utilisant la gomme arabique qui stabilise la suspension, ce qui permet d'employer des pipettes sans qu'il se forme un courant central plus riche en bactéries.

Cette méthode utilisée par KLEIN et de nombreux auteurs offre une certaine précision bien que de nombreuses causes d'erreurs viennent s'y greffer. Il est très difficile en effet d'avoir une anse de platine rigoureusement jaugée. Il est difficile aussi de savoir si tout le liquide a bien été mis sur la lamelle.

Numération microscopique d'un très petit volume d'émulsion bactérienne à l'aide d'une chambre de numération.

L'exactitude de cette méthode dépend de la précision des appareils utilisés. Elle n'a vraiment été mise au point que ces dernières années. Elle a été utilisée par FRED VLÈS (36), 1921, HENRICI (55), 1921, TRÖSTER (95), 1922. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les globules sanguins car, avec les microbes, certains échappent à la numération.

Évaluation du nombre microbien par numération microscopique comparative.

WRIGHT (102-103) en 1902 utilisa le premier cette méthode. Il fait un mélange à parties égales de suspension microbienne et de sang, il étale ce mélange sur lamelle, il

le fixe, le colore. Il détermine la fréquence relative entre les bactéries et les globules sanguins. Sachant que 1 millimètre cube de sang renferme 5 millions d'hématies, il obtient le nombre de microbes par centimètre cube par une simple règle de trois.

Par la suite on proposa de déterminer à l'hématimètre le nombre d'hématies par centimètre cube, avant chaque numération, car ce nombre peut varier.

DREYER (34) en 1921 propose de remplacer le sang humain par du sang de poule ; mais ces émulsions se conservent mal : c'est pourquoi FRIES (39) en 1921 remplace les hématies par des cellules levures. Cette méthode a été étudiée par RÉGNIER. On en reparlera ultérieurement.

MÉTHODE DONNANT LE NOMBRE DE MICROBES APPELÉS VIVANTS.

Numération après dilution et ensemencement en milieu liquide.

PASTEUR, 1860, KLEBS, 1873, LISTER, 1878, et MIQUEL, 1879 et 1880, utilisent cette méthode. Elle est basée sur les deux principes suivants :

1° Par des dilutions et des agitations successives, on peut obtenir des émulsions microbiennes dans lesquelles les bactéries sont nettement séparées les unes des autres ;

2° Si la dilution est suffisante, en ensemençant des parties égales de cette dilution dans un certain nombre de tubes de culture, il ne se produit de poussée que dans quelques tubes. Lorsque cette poussée ne se produit que dans 15 à 20 pour 100 des tubes ensemencés, on peut admettre que chaque tube développé provient d'une

bactérie. En tenant compte de la dilution, on pourra ainsi calculer le nombre de microbes dans l'émulsion primitive. C'est cette méthode qui est encore utilisée pour le dosage du Colibacille dans l'eau.

Numération après dilution en ensemencement sur milieux solidifiés.

KOCH en 1884 mélange à des suspensions microbiennes du bouillon gélatiné liquéfié et il coule ce mélange sur des plaques de verre horizontales.

A l'aide d'une lampe, il compte ensuite le nombre de colonies ainsi développées. PÉTRI utilise des cristallisoirs emboîtés l'un dans l'autre qui portent son nom, il remplace la gélatine par de la gélose.

En 1887 BUCHNER, LAUGARD, RIEDLIN (16) remplacent la loupe par le microscope, afin de compter un plus grand nombre de colonies.

En 1893 BRUNNER et ZAWADZKI (8) placent sous la boîte de Pétri un papier noir divisé en 16 secteurs et ils n'examinent qu'un certain nombre de ceux-ci.

LAFAR FRANZ (68), 1893, propose de diviser la boîte en sections de 1 centimètre cube.

MULLER (76) en 1895, BUCHNER (16) en 1895, HEHEWERTH (51) en 1901, EYKMAN (36) en 1904, OTTO RAHN (82) en 1906, J. E. LANE CLAYTON (24) en 1909, H. CHICK (21) en 1912, GLYNN POWELL (46) en 1913, PENFOLD (79) en 1914, GRAHAM SMITH (93) en 1921, JOHANNES ZEISSLER (104) en 1922, WILSON (99) en 1922, utilisent cette méthode en y apportant diverses modifications. R. DAVID (28) en 1931 montra que le nombre de

bactéries trouvé est toujours inférieur au nombre obtenu par la méthode comparative à l'aide des levures. Dans le premier cas, en effet, on ne compte que les germes susceptibles de se reproduire en milieu solidifié; dans le deuxième il s'agit de la totalité des bactéries.

*Numération microscopique des bactéries vivantes
d'après leur aspect morphologique.*

HANS HOECKSCHER (52-53) en 1921 propose de faire des numérations différentielles suivant la morphologie des microbes, les bactéries capables de se reproduire ayant un aspect différent des bactéries mortes. Mais cette méthode, qui paraît bonne en principe, présente de grosses difficultés pratiques, et ne paraît pas pouvoir être d'une application courante.

*Numération microscopique des bactéries vivantes
après coloration élective.*

Les bactéries vivantes et les bactéries mortes ne fixent pas également les colorants.

BURGESS (17) en 1920, FRASER (38) en 1921, FULMER (41) en 1921, appliquent ce procédé de différenciation aux levures. HENRICI (56-57) en 1923 propose de l'utiliser pour les bactéries.

On mélange intimement une quantité connue d'émulsion microbienne avec une quantité déterminée de solution aqueuse de rouge Congo à 2 pour 100, on laisse en contact 10 minutes.

Après ce temps on agite à nouveau, on en prélève $0^{cm^3},01$ avec une pipette capillaire et on place cette quantité

sur une lame où se trouve dessiné un carré de 2 centimètres de côté, on étale avec un fil de platine, on sèche et on plonge dans une solution d'acide chlorhydrique à 1 pour 100 dans l'alcool à 45°. Les bactéries vivantes au moment de la coloration ne prennent pas le colorant et apparaissent en blanc, tandis que les bactéries mortes apparaissent en bleu foncé.

D'après les travaux d'HENRICI lui-même, ce procédé présente de nombreuses causes d'erreurs. C'est ainsi que des bactéries tuées par le formol ne se colorent pas, tandis que des bactéries naturellement mortes et conservées dans le formol se colorent.

MÉTHODES BASÉES SUR L'ACTIVITÉ BIOCHIMIQUE DES BACTÉRIES.

F. REGNARD (83), 1882, BIERNACKI (5) 1891, W. HESSE (62), 1893, H. SCHLUTZ (89), 1907, H. LUHRIG et SARTORI (70), 1908, SLATOR (90), 1913, ABDERHALDEN (1), 1915, étudièrent la fermentation alcoolique et la quantité de gaz produite par les microbes; NAEGELI et SCHWENDENER (7), H. CARDOT et BACHRACH (3) en 1914 la quantité d'acide lactique, MICHAELIS et MARCORA (71) en 1921 la variation du pH dans la poussée du colibacille.

On proposa aussi des techniques utilisant l'ammonification, la nitrification et la fixation de l'azote.

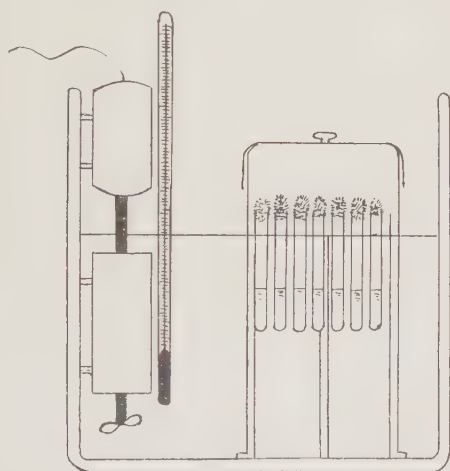
Ces méthodes ne peuvent s'appliquer qu'à un très petit nombre d'organismes, car nos connaissances biochimiques sont très limitées; et d'autre part l'action chimique due à la mise en liberté des ferments peut durer un temps assez long après l'arrêt de la multiplication.

CHAPITRE II

DESCRIPTION ET UTILISATION DE L'APPAREIL THERMOSTATIQUE

Description de l'appareil.

L'appareil qui a servi dans les expériences comprend :



une marmite calorifugée, un moteur qui produit l'agitation, un rhéostat permettant de faire varier l'intensité

du courant et une boîte en aluminium renfermant les tubes de culture.

La marmite calorifugée a été construite par la maison Poulenc ; elle renferme 15 litres d'eau. A sa partie supérieure est adapté un moteur de 1/100 de cheval. Ce moteur sert à faire tourner des ailettes au fond de la marmite de manière à entretenir un courant d'eau continu, et maintenir ainsi une température uniforme dans la masse liquide.

Cet appareil fonctionne sur un courant de 110 volts. Sur le fil conduisant le courant se trouve branché un rhéostat permettant de faire varier l'intensité.

Cet appareil ainsi constitué a dû être adapté à l'usage auquel il était destiné ; les tubes devaient plonger dans l'eau sans être mouillés dans leur partie supérieure. On a eu recours au dispositif suivant : une boîte en aluminium a été percée de 12 trous laissant passer les tubes suivant un cercle. Les tubes sont maintenus par des bagues de caoutchouc placées à leur sommet. La boîte, par l'intermédiaire d'un pied à trois branches, est maintenue au niveau de l'eau. Quand les tubes sont mis en place on les recouvre avec le couvercle de la boîte.

Enfin l'appareil comporte un thermomètre gradué en 1/10 de degré permettant à tout instant de contrôler la température.

Principe de l'appareil thermostatique.

La loi de Joule nous apprend que :

$$Q \text{ cal} = A \times R \text{ ohms} \times I^2 \text{ amp.} \times T \text{ sec.}$$

qui peut s'écrire :

$$Q \text{ cal} = A \times E \text{ volt} \times I \text{ amp.} \times T \text{ sec.}$$

c'est la base du chauffage électrique.

L'eau de l'appareil devra se maintenir à une température donnée.

Le voltage étant constant, il faut déterminer l'intensité du courant nécessaire pour maintenir cette température.

GESTEAU (45), 1934, a montré que cette quantité calorifique pour un appareil donné dépend de la différence entre la température de l'appareil et celle de l'extérieur ; elle est indépendante du degré thermométrique. Cette quantité sera donc la même si l'extérieur est à 24° et que l'on veuille maintenir l'appareil à 37° ou si l'extérieur est à 21° et que l'on veuille maintenir l'appareil à 34°.

On fera donc deux courbes d'échange :

Dans la première, on part de la température de 24° pour aboutir à 50°, la température extérieure étant de 24° et le courant de 2 amp. 7.

On notera le temps nécessaire pour faire monter l'eau d'un degré.

Dans la deuxième courbe, on partira d'eau à 50°, la température extérieure étant de 24°, et on notera le temps nécessaire pour faire baisser la température de l'eau d'un degré.

Dans la première courbe, on constate que les temps augmentent au fur et à mesure que l'on passe de 24° à 50° et dans la deuxième qu'ils augmentent au fur et à mesure que la température baisse.

Voici les chiffres obtenus dans la première courbe :

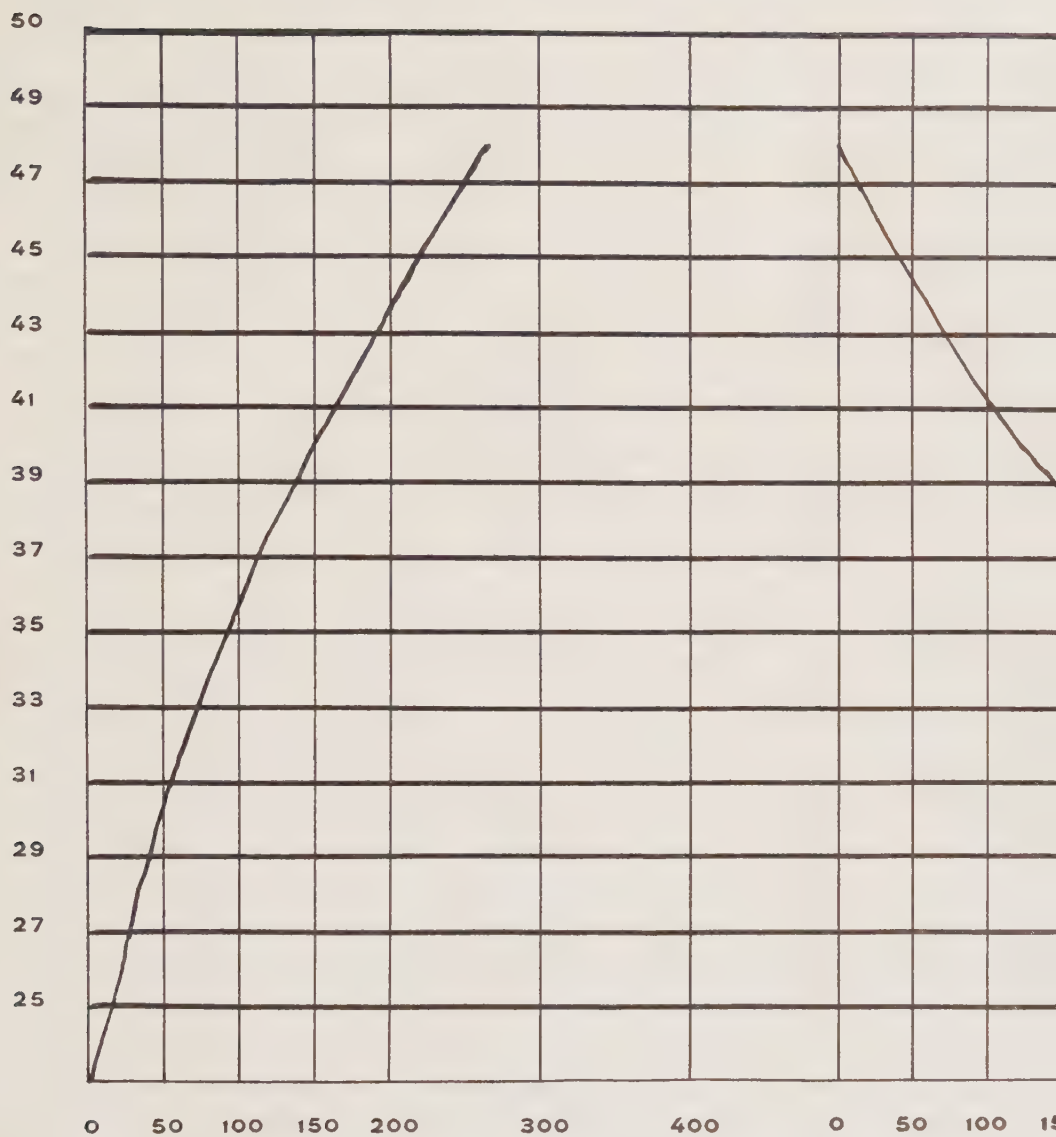
24° } 7 min.	38° 10 min. 30 sec.
25° }	39° 11 min.
26° 7 min.	40° 11 min.
27° 7 min.	41° 11 min. 30 sec.
28° 7 min.	42° 12 min.
29° 7 min.	43° 12 min. 30 sec.
30° 7 min.	44° 13 min.
31° 7 min. 30 sec.	45° 13 min. 30 sec.
32° 8 min.	46° 14 min.
33° 8 min. 30 sec.	47° 14 min. 30 sec.
34° 9 min.	48° 15 min.
35° 9 min. 30 sec.	49° 15 min. 30 sec.
36° 9 min. 30 sec.	50° 16 min.
37° 10 min.	

Voici les chiffres obtenus dans la deuxième courbe :

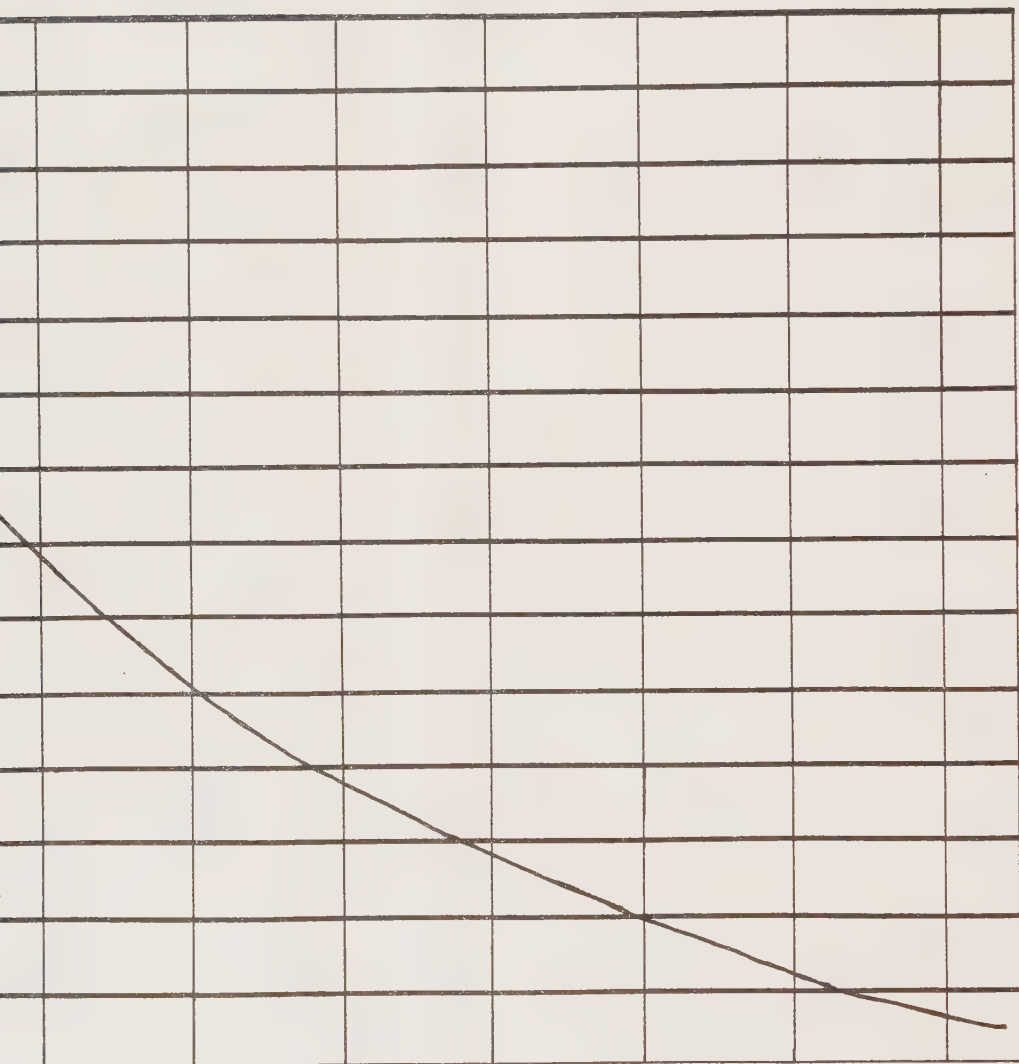
50° } 12 min.	37° 27 min.
49° }	36° 30 min.
48° 13 min.	35° 33 min.
47° 14 min.	34° 36 min. 30 sec.
46° 15 min.	33° 40 min.
45° 16 min.	32° 44 min.
44° 17 min.	31° 48 min.
43° 18 min.	30° 53 min.
42° 19 min.	29° 58 min.
41° 20 min.	28° 67 min.
40° 22 min.	27° 81 min.
39° 23 min.	26° 109 min.
38° 24 min. 30 sec.	

Utilisation de l'appareil.

Ces courbes étant construites, il va être possible de déterminer l'intensité du courant nécessaire pour mainte-



Courbe d'écha



200
thermique.

300

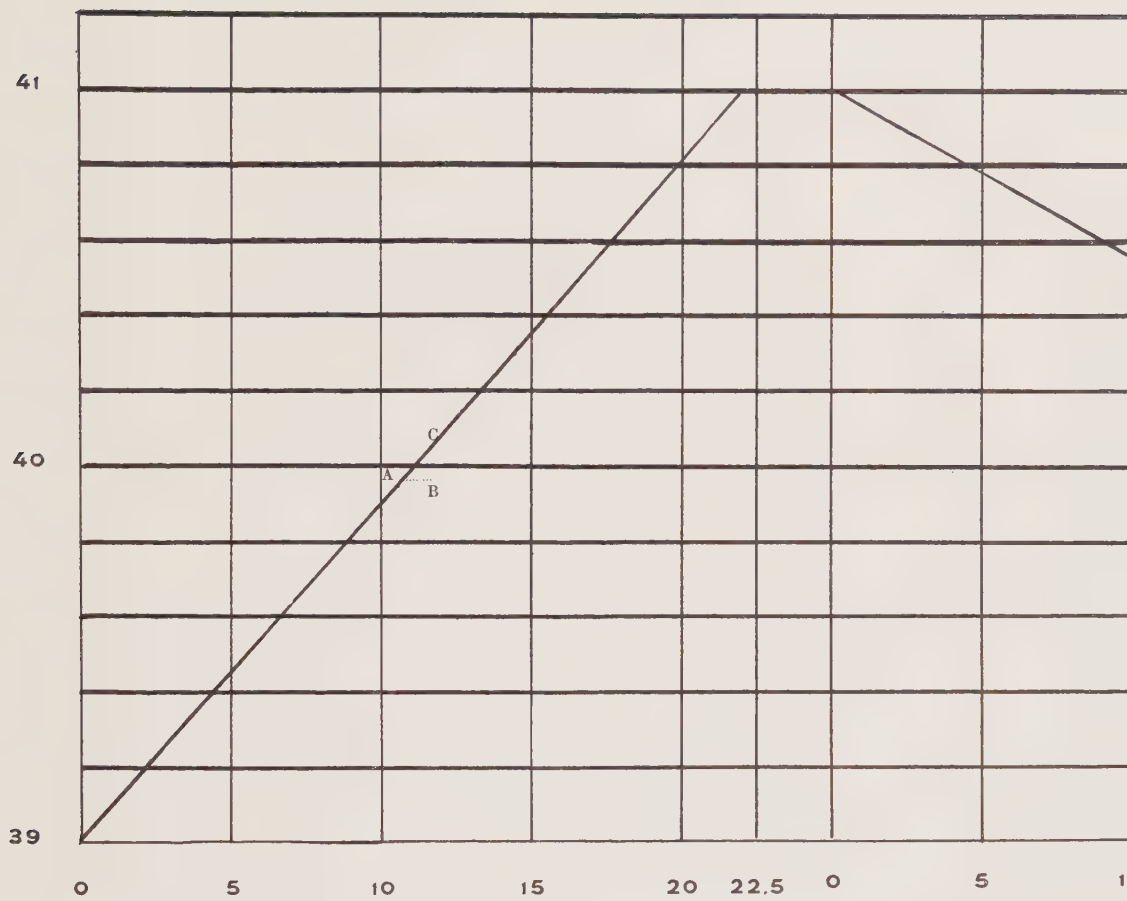
400

500

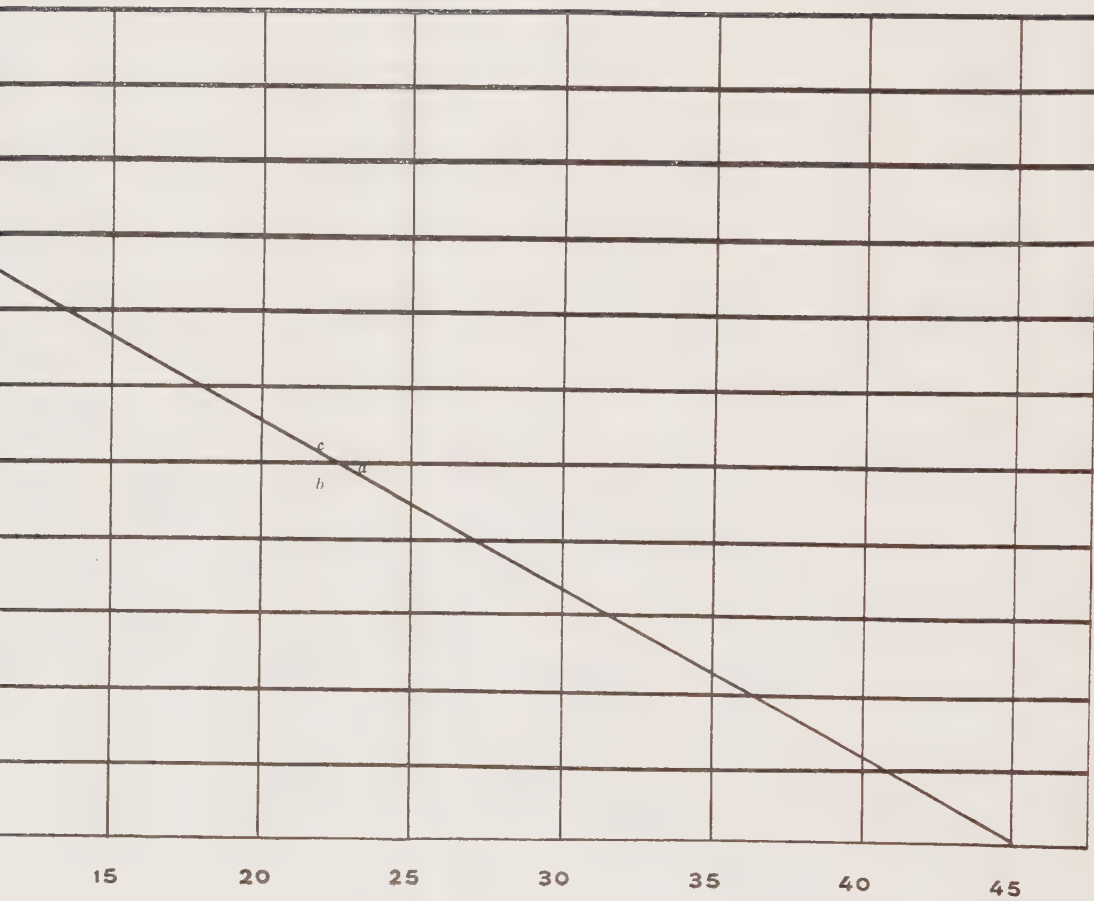
600

700

800



Utilisation de la cour



échange thermique.

nir l'appareil à la température de 40° par exemple. Pour cela on reproduira à une plus grande échelle les parties ascendantes et descendantes de la courbe entre 39° et 41° .

On obtient ainsi les deux courbes ci-contre.

On considère l'effet de la source calorifique utilisée pendant une minute lorsque la température de l'enceinte est voisine de 40° . A ce moment la source sert d'une part à compenser la perte de chaleur de l'enceinte, et d'autre part à en élever la température.

La surface du triangle abc est proportionnelle au nombre de calories-minutes employées à la compensation ; celle du triangle ABC à la quantité de chaleur utilisée pour l'élévation de la température dans le même temps.

Soit Q le nombre de calories-minutes produites, q celui des calories-minutes de compensation, q' celui des calories-minutes d'élévation et soit M la masse à échauffer on aura :

$$Q = q + q'$$

$$\text{Or } q = M \times bc \quad \text{et} \quad q' = M \times BC.$$

On peut donc écrire :

$$Q = M(BC + bc) = Mbc \left(1 + \frac{BC}{bc} \right).$$

Or Mbc est justement le nombre de calories-minutes compensant exactement les pertes. Si l'on appelle i l'intensité du courant correspondant à ce nombre R , la valeur de la résistance peut s'exprimer par la formule $ARi^2 \times 60$. De même le nombre de calories-minutes totales est donné par l'expression $ARI^2 \times 60$, si I représente l'intensité du courant de chauffage.

Il vient donc

$$ARI^2 \times 60 = ARi^2 \times 60 \left(1 + \frac{BC}{bc} \right),$$

d'où on tire

$$i = \frac{I}{\sqrt{1 + \frac{BC}{bc}}}.$$

Dans l'exemple choisi, on a :

$$BC = 45 \text{ divisions,}$$

$$bc = 22 \text{ divisions } 5,$$

$$I = 2 \text{ ampères } 7.$$

On trouve ainsi $i = 1$ ampère 56.

On voit donc que grâce à cette courbe on peut déterminer l'intensité du courant compensateur, puisque l'expérience a montré qu'elle dépend uniquement de la différence entre la température que l'on désire obtenir et la température ambiante.

On obtiendra donc la même intensité i si on cherche l'intensité nécessaire pour maintenir de l'eau à 36° avec une température extérieure de 20° .

Grâce au rhéostat on peut, ayant déterminé par le calcul l'intensité du courant compensateur, l'obtenir en faisant varier plus ou moins les résistances.

Par cette méthode on a toujours obtenu dans les expériences des résultats très satisfaisants, la température ne variant pas au delà de $1/10$ de degré.

COMPOSITION DU MILIEU NUTRITIF

Le bouillon utilisé dans les expériences renferme :

Glucose pur anhydre.	1 gramme.
Peptone bactériologique spéciale	
Byla.	20 grammes.
Glycérine pure à 30°.	50 grammes.
Eau, q. s. p.	1 000 centimètres cubes.

La peptone employée est une peptone pancréatique de viande de bœuf. Elle est d'une couleur blanc jaunâtre, de saveur amère, complètement soluble dans l'eau froide. Le bouillon est ajusté au pH 7,4 correspondant à l'échelle colorimétrique de M. P. BRUÈRE.

Échelle colorimétrique de M. P. Bruère (10-11).

Un des principaux inconvénients des méthodes colorimétriques pour la mesure des indices de pH et en particulier des échelles de CLARK et LUBS réside dans leur instabilité. On observe en effet une floculation plus ou moins accentuée des matières colorantes par les électrolytes des solutions dites tampon.

Le remplacement fréquent des échelles nécessite une collection de solutions titrées de préparation minutieuse. La méthode de M. P. BRUÈRE les remplace par des solutions stables.

Dans l'échelle de M. P. BRUÈRE on utilise des électrolytes colorés ne donnant pas d'incompatibilité parmi les constituants. Les teintes progressives sont obtenues par simple mélange et se conservent bien à la lumière.

L'échelle de CLARK et LUBS au bleu de bromothymol est construite grâce aux solutions suivantes :

A. Solution cobaltique de bichromate de potasse.

Solution au 1/5 d'azotate de cobalt : 2 centimètres cubes.

Solution à 0,30 pour 1 000 de bichromate de potasse : 98 centimètres cubes.

Cette solution correspond à $pH \leq 6,0$.

B. Solution cobaltique de sulfate de cuivre.

Solution au 1/5 d'azotate de cobalt : 6 centimètres cubes.

Solution au 1/10 de sulfate de cuivre : 95 centimètres cubes.

Cette solution correspond à $pH \geq 7,6$.

Les teintes intermédiaires sont fournies par les mélanges suivants :

Échelle correspondant au bleu de bromothymol.

Indices de pH.	6,0	6,2	6,4	6,6	6,8	7,0	7,2	7,4	7,6
Solution A jaune.	8cm ³	7cm ³	6cm ³	5cm ³	4cm ³	3cm ³	2cm ³	1cm ³	»
Solution B bleue.	»	1cm ³	2cm ³	3cm ³	4cm ³	5cm ³	6cm ³	7cm ³	8cm ³
Colorations.	jaune	jaune verdâtre	vert	vert bleuâtre	bleu				

Pratiquement il suffit d'assortir 9 tubes à essai de petit diamètre, de 12 à 14 millimètres, en verre incolore, et de les garnir avec les solutions qui constituent l'échelle ; on ferme à la flamme pour la commodité des opérations de titrage colorimétrique.

L'échelle au bleu de bromothymol permet le contrôle rapide de la neutralité de l'eau destinée aux opérations de laboratoire ou à la préparation des solutions injectables et des bouillons de culture.

Une deuxième échelle a été construite par BRUÈRE qui correspond aux deux échelles de CLARK et LUBS, au rouge de méthyle et au rouge de phénol. Cette échelle est construite grâce aux solutions suivantes :

C. Solution acétique de chlorure de cobalt.

Solution au 1/10 de chlorure de cobalt : 26 centimètres cubes.

Acide acétique pur : 74 centimètres cubes.

Mélanger et filtrer.

Comparativement aux échelles de CLARK et LUBS (construites avec V gouttes d'indicateur pour 5 centimètres cubes de solution tampon) et pour 1 tube en verre incolore de même diamètre, la coloration rose obtenue correspond à $pH \leq 4,4$ avec le rouge de méthyle et à $pH \geq 8,4$ avec le rouge de phénol.

D. Solution cobaltique de bichromate de potassium.

Solution au 1/10 de chlorure de cobalt : 4 centimètres cubes.

Solution à 0,03 pour 100 de bichromate de potassium : 96 centimètres cubes.

Dans les mêmes conditions d'observation la coloration jaune correspond :

à $pH \geq 6,0$ avec le rouge de méthyle,

à $pH \leq 6,8$ avec le rouge de phénol.

Les teintes intermédiaires sont fournies par les deux tableaux suivants :

Échelle correspondant au rouge de méthyle.

Indices de pH. . .	4,4	4,6	4,8	5,0	5,2	5,4	5,6	5,8	6,0
Solution C rose. .	8cm ³	7cm ³	6cm ³	5cm ³	4cm ³	3cm ³	2cm ³	1cm ³	»
Solution D jaune. .	»	1cm ³	2cm ³	3cm ³	4cm ³	5cm ³	6cm ³	7cm ³	8cm ³
Teintes progressives.	rose	rose orangé		orangé	orangé		orangé jaune	jaune	

Échelle correspondant au rouge de phénol.

Indices de pH. . .	6,8	7,0	7,2	7,4	7,6	7,8	8,0	8,2	8,4
Solution C rose. . .	»	1cm ³	2cm ³	3cm ³	4cm ³	5cm ³	6cm ³	7cm ³	8cm ³
Solution D jaune. .	8cm ³	7cm ³	6cm ³	5cm ³	4cm ³	3cm ³	2cm ³	1cm ³	»
Teintes progressives.	jaune	jaune orangé		orangé	orangé rouge		rouge		

Cette zone acido-alcaline faible est intéressante pour l'étude des liquides biologiques, le contrôle de la neutralité des ampoules, l'appréciation (du degré d'acidité ou d'alcalinité) des milieux renfermant des sels hydrolysables pour lesquels la teinture ou le papier de tournesol ne fournissent que des indications imprécises.

NUMÉRATION MICROBIENNE

On a utilisé la méthode de numération microscopique indirecte à l'aide des levures décrites par REGNIER et NEIPP (84). On titre une émulsion de levures et de ce titre on déduit celui d'une émulsion bactérienne.

Elle comprend donc deux opérations : a) la préparation

de l'émulsion de levures et son titrage ; b) la numération des bactéries.

a) Préparation de l'émulsion de levures.

On utilise comme levure, de la levure de boulanger. Pour la facilité des numérations, on emploie autant que possible des émulsions renfermant de 200 à 300 millions de cellules par centimètre cube.

Pour les préparer, on prélève dans la masse constituée par la levure agglomérée, de petits fragments dont l'ensemble occupe un volume égal à 1 ou 2 centimètres cubes. On aura soin de choisir une levure fraîche et de rejeter les produits desséchés ou partiellement autolysés. On place ces fragments dans un mortier et on les émulsionne dans 100 centimètres cubes d'eau distillée stérile. L'eau est ajoutée par petites portions qu'on décante au fur et à mesure dans une fiole conique de 250 centimètres cubes stérilisée et renfermant des billes de verre. Lorsque tout le liquide est passé dans la fiole, on bouche au liège et on agite énergiquement pour dissocier les amas de cellules. Avec un peu d'habitude et surtout en comparant avec une émulsion plus ancienne et déjà dénombrée, on peut se rendre compte si la suspension ainsi préparée se rapproche du titre cherché. Dans le cas où elle s'en écarte trop, il est facile d'y remédier par addition d'eau distillée stérile ou par addition d'une nouvelle quantité de levures.

Pour procéder à la numération de cette émulsion, on en prélève après agitation, 1 centimètre cube qu'on porte dans un tube en pyrex renfermant 9 centimètres cubes d'eau

distillée stérile. On agite et c'est sur cette dilution à 1/10 qu'on effectue une numération hématimétrique ordinaire. Avec l'hématimètre de Malassez, il est bon de compter les cellules déposées sur 4 rectangles correspondant à un volume égal à 1/100 de millimètre cube. On répétera la même opération le lendemain et on prendra la moyenne des nombres trouvés. Le chiffre obtenu représente en millions le nombre de cellules de levure contenues dans un centimètre cube de l'émulsion examinée.

En effet chaque rectangle représente 1/100 de millimètre cube et on effectue chaque numération sur une dilution à 1/10 de l'émulsion primitive.

A titre d'exemple, on rapporte ici les résultats donnés par une opération pour les deux premiers rectangles et on indique en outre les chiffres obtenus pour tous les carrés :

1 ^{er} rectangle :	14	8	9	15
	12	11	11	9
	13	13	10	16
	6	17	20	10
	12	7	14	15
	57 + 56 + 64 + 65 = 242			

2 ^e rectangle :	12	11	14	9
	15	15	10	11
	7	21	14	14
	16	6	12	21
	17	11	10	20
	67 + 64 + 60 + 75 = 266			

3^e à 8^e rectangle :

255, 241, 294, 258, 271, 281.

Moyenne de tous ces nombres = $\frac{2111}{8}$ = sensiblement 264.

L'émulsion examinée renferme 264 000 000 de cellules par centimètre cube.

b) Numération des bactéries.

On commence par rendre bien homogène l'émulsion de levures et la suspension microbienne à examiner. On porte ensuite 1 centimètre cube de chacun de ces liquides dans une fiole conique de 50 centimètres cubes renfermant déjà des billes de verre, et on mélange le tout en agitant fortement. Au moyen d'une pipette, on dépose alors une goutte du mélange sur 4 lames de verre soigneusement lavées au mélange sulfo-chromique, puis passées à l'alcool ammoniacal.

On étale ces gouttes à l'aide d'une anse de platine. La préparation est alors séchée par agitation à l'air, fixée par l'alcool et colorée par de la fuchsine à l'eau pendant 2 minutes.

Cette fuchsine est préparée suivant la formule de RÉGNIER.

Fuschine.	0 ^{gr} , 10
Alcool à 90°.	1 centimètre cube
Eau distillée.	100 —

Ce procédé a l'avantage de ne nécessiter qu'un lavage terminal. On effectuera celui-ci avec beaucoup de précaution pour ne pas risquer d'entraîner, avec les eaux de lavage, des bactéries ou des levures.

Il ne reste plus qu'à procéder à la numération comparative de ces deux sortes d'éléments en examinant pour cela un grand nombre de champs (au moins 50 et de préférence

100 ou un nombre supérieur). Ces champs sont pris sur les trois lames qui présentent les étalements les plus réguliers et les mieux colorés. On aura également soin de choisir dans les différentes régions de ces lames. La numération est faite à l'aide d'un objectif à immersion. On fait d'une part la somme des bactéries et d'autre part la somme des levures observées. Le nombre de microbes contenus dans 1 centimètre cube du liquide à examiner est obtenu en multipliant le titre de l'émulsion de levure par le nombre des microbes trouvé et en divisant par le nombre de levures.

Il est préférable de ne pas avoir une trop grande disproportion entre le nombre des microbes et celui des cellules de levures, ce qui obligerait à compter un très grand nombre de champs pour avoir un résultat valable. On aura donc avantage à étendre avant de l'examiner une suspension bactérienne trop riche. On tiendra compte de la dilution utilisée dans le calcul des résultats.

ÉTUDE DÉTAILLÉE D'UNE MULTIPLICATION DE STAPHYLOCOQUE

On prend comme exemple la température de 42° et une émulsion de levures renfermant 252 millions de levures par centimètre cube.

En étalant sur 4 lames, un mélange à parties égales de suspension de levures et d'émulsion de Staphylocoques et en procédant à la numération comparative des deux sortes d'éléments, on trouve 741 cocci pour 361 levures.

L'émulsion microbienne ainsi préparée renferme donc :

$$\frac{252\,000\,000 \times 741}{361} = 517\,000\,000$$

de Staphylocoques par centimètre cube.

Pour obtenir une émulsion renfermant 50 000 000 de microbes par centimètre cube, il faudra donc mettre 9^{cn3},7 d'émulsion dans 100 centimètres cubes de bouillon. On fait ainsi une numération toutes les heures.

Au temps 0 on fait une première numération et on trouve :

1 630 levures,

322 cocci.

L'émulsion de levures étant de 252 000 000 par centimètre cube, le nombre de cocci par centimètre cube est de :

$$\frac{252\,000\,000 \times 322}{1630} = 50\,000\,000.$$

Au bout d'une heure, on fait une nouvelle numération et on trouve :

419 levures,

99 cocci.

L'émulsion de levures étant de 252 000 000 par centimètre cube, le nombre de cocci par centimètre cube est de :

$$\frac{252\,000\,000 \times 99}{419} = 60\,000\,000.$$

On procède à une numération toutes les heures, en utilisant l'émulsion de levures titrée à 252 000 000 par centimètre cube et on trouve ainsi :

Au bout de 2 heures :

527 levures,

177 cocci,

d'où le nombre de cocci par centimètre cube est de :

$$\frac{252\ 000\ 000 \times 177}{527} = 82\ 000\ 000.$$

Au bout de 3 heures :

428 levures,

221 cocci,

d'où le nombre de cocci par centimètre cube est de

$$\frac{252\ 000\ 000 \times 221}{428} = 130\ 000\ 000.$$

Au bout de 4 heures :

312 levures,

272 cocci,

d'où le nombre de cocci par centimètre cube est de :

$$\frac{252\ 000\ 000 \times 272}{312} = 220\ 000\ 000.$$

Au bout de 5 heures :

408 levures,

339 cocci,

d'où le nombre de cocci par centimètre cube est de :

$$\frac{252\ 000\ 000 \times 339}{408} = 210\ 000\ 000.$$

Au bout de 6 heures :

401 levures,

241 cocci,

d'où le nombre de cocci par centimètre cube est de :

$$\frac{252\ 000\ 000 \times 241}{401} = 151\ 500\ 000.$$

Au delà de 6 heures, la numération devient impossible, car il apparaît des formes d'involution. Ces formes apparaissent à partir de la 7^e heure à 40°, 41°, 42°, 43°; à partir de la 6^e heure à 44°; et à partir de la 5^e heure à 45°.

On admet qu'une cellule microbienne se multiplie par scissiparité, c'est-à-dire qu'elle se partage en deux nouvelles cellules. Connaissant le nombre de microbes au début et à la fin d'une expérience, il est donc possible de calculer le nombre de bipartitions produites dans un temps donné, et par suite de déterminer la durée d'une bipartition c'est-à-dire le temps nécessaire à la formation d'une génération.

On calcule par exemple le nombre de générations produites pendant une période d'une heure. On désigne par a le nombre de microbes au début de l'expérience, b le nombre de microbes à la fin et x le nombre de bipartitions cherché.

Après 1 bipartition, on a $a \times 2$ microbes; après 2 bipartitions, on a $a \times 2 \times 2$ microbes ou $a \times 2^2$; après x bipartitions on doit avoir $a \times 2^x$.

On peut donc écrire $b = a \times 2^x$ ou $2^x = \frac{b}{a}$;

par suite :

$$\log 2^x = \log \frac{b}{a} \quad \text{ou} \quad \log 2^x = \log b - \log a$$

et

$$x = \frac{\log b - \log a}{\log 2}$$

Comme ces x bipartitions se sont produites en 1 heure ou 60 minutes, on peut dire que la durée moyenne d'une bipartition pendant cette heure est de $\frac{60}{x}$.

On calcule maintenant le nombre de bipartitions et le temps de génération pendant la première heure à 42°, par exemple :

$$\text{Ici} \quad a = 50\,000\,000,$$

$$b = 60\,000\,000,$$

$$\text{Log } a = \bar{7},69\,897,$$

$$\text{Log } b = \bar{7},77\,815,$$

$$\text{Log } 2 = \bar{0},30\,103,$$

d'où il suit que :

$$x = \frac{\bar{7},77\,815 - \bar{7},69\,897}{0,30\,103},$$

$$x = 0,263.$$

Il y a donc 0,263 bipartition en 1 heure ; par suite, la durée de formation d'une bipartition ou le temps de génération sera égal à :

$$\frac{60}{0,263} = 228 \text{ minutes.}$$

En calculant ainsi, on trouve le nombre de bipartitions et le temps de génération pendant chaque période donnée.

Voici les résultats obtenus aux diverses températures :

25°	NOMBRE DE COCCI PAR CM ³	LOGARITHME	NOMBRE DE BIPARTITIONS	TEMPS DE GÉNÉRATION
0 h.	50 000 000	7,69897		
1 h.	59 000 000	7,77085	0,238	256 m.
2 h.	84 000 000	7,92428	0,509	117 m.
3 h.	124 000 000	8,09342	0,561	105 m.
4 h.	178 000 000	8,25042	0,521	115 m.
5 h.	247 000 000	8,39270	0,472	127 m.
6 h.	325 000 000	8,51188	0,429	139 m.
7 h.	441 000 000	8,64444	0,440	136 m.
8 h.	590 000 000	8,77085	0,486	143 m.
26°	NOMBRE DE COCCI PAR CM ³	LOGARITHME	NOMBRE DE BIPARTITIONS	TEMPS DE GÉNÉRATION
0 h.	50 000 000	7,69897		
1 h.	59 500 000	7,77452	0,250	240 m.
2 h.	86 500 000	7,93702	0,539	111 m.
3 h.	130 000 000	8,11394	0,587	102 m.
4 h.	190 000 000	8,27875	0,547	109 m.
5 h.	260 000 000	8,41497	0,452	132 m.
6 h.	355 000 000	8,55023	0,449	133 m.
7 h.	472 000 000	8,67394	0,410	146 m.
8 h.	645 000 000	8,80956	0,450	133 m.
27°	NOMBRE DE COCCI PAR CM ³	LOGARITHME	NOMBRE DE BIPARTITIONS	TEMPS DE GÉNÉRATION
0 h.	50 000 000	7,69897		
1 h.	60 000 000	7,77815	0,263	228 m.
2 h.	87 000 000	7,93952	0,536	111 m.
3 h.	134 000 000	8,12710	0,623	96 m.
4 h.	204 000 000	8,30963	0,606	99 m.
5 h.	281 000 000	8,44871	0,462	129 m.
6 h.	385 000 000	8,58546	0,454	132 m.
7 h.	510 000 000	8,70757	0,405	148 m.
8 h.	710 000 000	8,85126	0,477	126 m.

28°	NOMBRE DE COCCI PAR CM ³	LOGARITHME	NOMBRE DE BIPARTITIONS	TEMPS DE GÉNÉRATION
—	—	—	—	—
0 h.	50 000 000	7,69897		
1 h.	60 500 000	7,78176	0,275	218 m.
2 h.	87 500 000	7,94201	0,532	112 m.
3 h.	137 500 000	8,13672	0,646	92 m.
4 h.	209 000 000	8,32015	0,609	98 m.
5 h.	290 000 000	8,46240	0,472	105 m.
6 h.	410 000 000	8,61278	0,499	120 m.
7 h.	540 000 000	8,73239	0,397	151 m.
8 h.	745 000 000	8,87216	0,464	129 m.

29°	NOMBRE DE COCCI PAR CM ³	LOGARITHME	NOMBRE DE BIPARTITIONS	TEMPS DE GÉNÉRATION
—	—	—	—	—
0 h.	50 000 000	7,69897		
1 h.	61 000 000	7,78533	0,286	209 m.
2 h.	89 500 000	7,95182	0,553	108 m.
3 h.	139 000 000	8,14301	0,635	94 m.
4 h.	215 000 000	8,32244	0,596	100 m.
5 h.	306 000 000	8,48572	0,542	110 m.
6 h.	440 000 000	8,64345	0,523	114 m.
7 h.	595 000 000	8,77452	0,435	138 m.
8 h.	800 000 000	8,90309	0,427	140 m.

30°	NOMBRE DE COCCI PAR CM ³	LOGARITHME	NOMBRE DE BIPARTITIONS	TEMPS DE GÉNÉRATION
—	—	—	—	—
0 h.	50 000 000	7,69897		
1 h.	61 000 000	7,78533	0,286	209 m.
2 h.	91 000 000	7,95904	0,577	104 m.
3 h.	144 500 000	8,15987	0,667	90 m.
4 h.	220 500 000	8,34341	0,609	98 m.
5 h.	320 000 000	8,50515	0,537	111 m.
6 h.	470 000 000	8,67210	0,554	108 m.
7 h.	635 000 000	8,80277	0,433	138 m.
8 h.	839 000 000	8,92376	0,401	149 m.

31°	NOMBRE DE COCCI PAR CM ³	LOGARITHME	NOMBRE DE BIPARTITIONS	TEMPS DE GÉNÉRATION
—	—	—	—	—
0 h.	50 000 000	7,69897		
1 h.	62 500 000	7,79588	0,321	187 m.
2 h.	97 500 000	7,98900	0,641	93 m.
3 h.	154 500 000	8,18893	0,664	90 m.
4 h.	225 000 000	8,35218	0,542	110 m.
5 h.	345 000 000	8,53782	0,616	97 m.
6 h.	510 000 000	8,70757	0,563	106 m.
7 h.	696 000 000	8,84198	0,446	132 m.
8 h.	951 400 000	8,97836	0,453	136 m.
32°	NOMBRE DE COCCI PAR CM ³	LOGARITHME	NOMBRE DE BIPARTITIONS	TEMPS DE GÉNÉRATION
—	—	—	—	—
0 h.	50 000 000	7,69897		
1 h.	63 500 000	7,80277	0,344	173 m.
2 h.	100 000 000	8,00000	0,655	91 m.
3 h.	159 000 000	8,20140	0,669	89 m.
4 h.	252 500 000	8,40226	0,667	89 m.
5 h.	360 000 000	8,55630	0,511	117 m.
6 h.	503 000 000	8,70157	0,482	124 m.
7 h.	755 000 000	8,87795	0,585	102 m.
8 h.	1 037 500 000	9,01578	0,457	131 m.
33°	NOMBRE DE COCCI PAR CM ³	LOGARITHME	NOMBRE DE BIPARTITIONS	TEMPS DE GÉNÉRATION
—	—	—	—	—
0 h.	50 000 000	7,69897		
1 h.	64 000 000	7,80618	0,356	169 m.
2 h.	100 000 000	8,00000	0,643	93 m.
3 h.	161 000 000	8,20683	0,687	87 m.
4 h.	263 500 000	8,42079	0,710	84 m.
5 h.	390 000 000	8,59106	0,565	106 m.
6 h.	575 000 000	8,75967	0,560	107 m.
7 h.	850 000 000	8,92942	0,560	107 m.
8 h.	1 200 000 000	9,07918	0,497	120 m.

34°	NOMBRE DE COCCI PAR CM ³	LOGARITHME	NOMBRE DE BIPARTITIONS	TEMPS DE GÉNÉRATION
0 h.	50 000 000	7,69897		
1 h.	64 500 000	7,80956	0,367	163 m.
2 h.	105 000 000	8,02119	0,703	85 m.
3 h.	170 000 000	8,23045	0,695	86 m.
4 h.	263 500 000	8,42078	0,632	94 m.
5 h.	410 000 000	8,61384	0,641	93 m.
6 h.	620 000 000	8,79239	0,593	101 m.
7 h.	950 000 000	8,97772	0,615	97 m.
8 h.	1 320 000 000	9,12057	0,474	126 m.
35°	NOMBRE DE COCCI PAR CM ³	LOGARITHME	NOMBRE DE BIPARTITIONS	TEMPS DE GÉNÉRATION
0 h.	50 000 000	7,69897		
1 h.	65 000 000	7,81291	0,378	158 m.
2 h.	112 000 000	8,04922	0,785	76 m.
3 h.	193 000 000	8,28556	0,785	76 m.
4 h.	310 000 000	8,49136	0,683	87 m.
5 h.	460 000 000	8,66276	0,569	105 m.
6 h.	700 000 000	8,84510	0,605	99 m.
7 h.	1 050 000 000	9,02119	0,584	102 m.
8 h.	1 475 000 000	9,16879	0,490	122 m.
36°	NOMBRE DE COCCI PAR CM ³	LOGARITHME	NOMBRE DE BIPARTITIONS	TEMPS DE GÉNÉRATION
0 h.	50 000 000	7,69897		
1 h.	66 000 000	7,81954	0,400	150 m.
2 h.	115 000 000	8,06070	0,801	74 m.
3 h.	202 500 000	8,30643	0,816	73 m.
4 h.	335 000 000	8,52504	0,726	82 m.
5 h.	525 000 000	8,72016	0,648	94 m.
6 h.	800 000 000	8,90309	0,607	98 m.
7 h.	1 210 000 000	9,08279	0,596	100 m.
8 h.	1 692 000 000	9,22840	0,482	124 m.

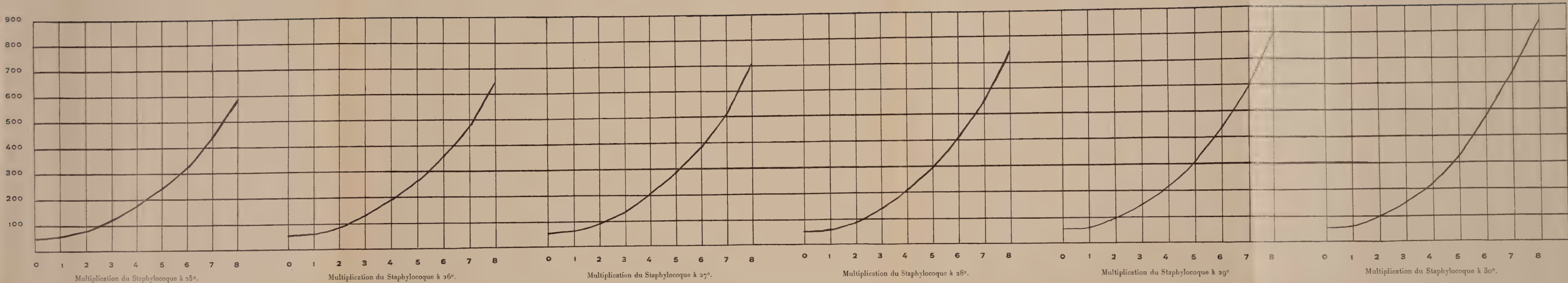
37°	NOMBRE DE COCCI	LOGARITHME	NOMBRE	TEMPS
	PAR CM ³		DE BIPARTITIONS	DE GÉNÉRATION
—	—	—	—	—
0 h.	50 000 000	7,69897		
1 h.	66 500 000	7,82282	0,411	145 m.
2 h.	116 500 000	8,06633	0,808	74 m.
3 h.	206 500 000	8,31492	0,815	72 m.
4 h.	355 000 000	8,55023	0,781	76 m.
5 h.	575 000 000	8,75967	0,695	86 m.
6 h.	890 000 000	8,94939	0,630	95 m.
7 h.	1 320 000 000	9,12057	0,568	105 m.
8 h.	1 915 000 000	9,28217	0,536	111 m.
12 h.	4 500 000 000	9,65321	1,23	195 m.
16 h.	6 600 000 001	9,81954	0,552	434 m.
20 h.	8 400 000 000	9,92428	0,347	691 m.
24 h.	10 000 000 000	10,00000	0,251	956 m.
28 h.	11 200 000 000	10,04922	0,163	1 472 m.
32 h.	11 800 000 000	10,07188		
36 h.	12 200 000 000	10,08636		
40 h.	12 400 000 000	10,09342		
44 h.	12 500 000 000	10,09691		

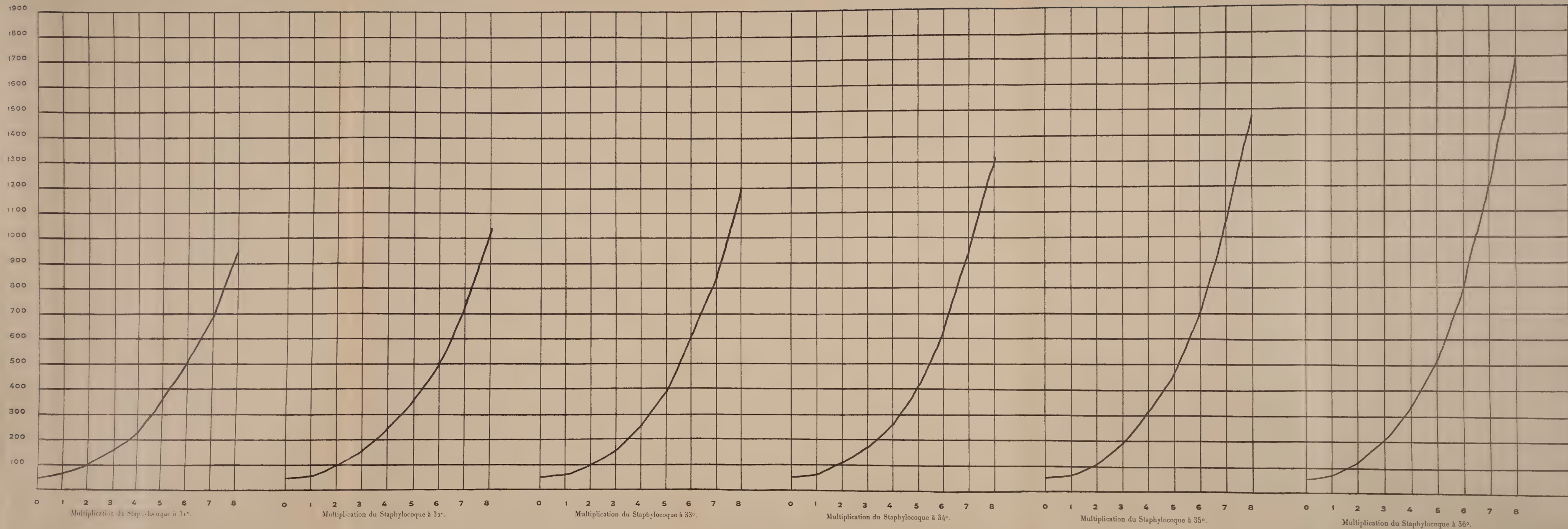
38°	NOMBRE DE COCCI PAR CM ³	LOGARITHME	NOMBRE DE BIPARTITIONS	TEMPS DE GÉNÉRATION
0 h.	50 000 000	7,69897	0,367	163 m.
1 h.	64 500 000	7,80956	0,632	94 m.
2 h.	100 000 000	8,00000	0,807	74 m.
3 h.	175 500 000	8,24304	0,777	77 m.
4 h.	300 000 000	8,47712	0,693	86 m.
5 h.	485 000 000	8,68574	0,628	95 m.
6 h.	750 000 000	8,87506	0,584	102 m.
7 h.	1 125 000 000	9,05115	0,508	118 m.
8 h.	1 600 000 000	9,20412	0,392	153 m.
9 h.	2 100 000 000	9,32222	0,257	233 m.
10 h.	2 510 000 000	9,39967	0,170	352 m.
11 h.	2 825 000 000	9,45102	0,110	543 m.
12 h.	3 050 000 000	9,48430	0,239	1 004 m.
16 h.	3 600 000 000	9,55630		
20 h.	3 850 000 000	9,58546		
22 h.	3 900 000 000	9,59106		
24 h.	3 950 000 000	9,59660		

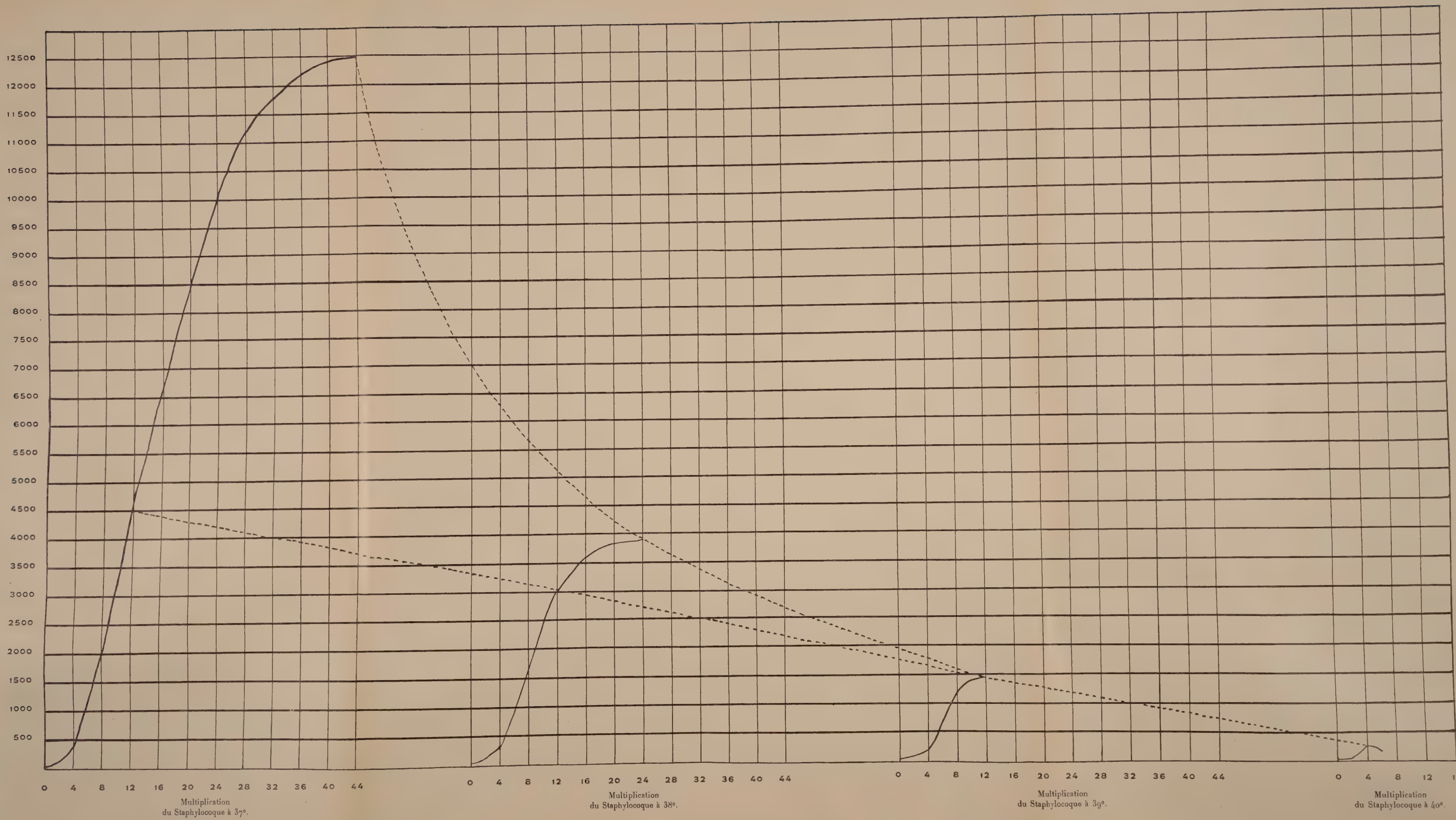
39°	NOMBRE DE COCCI PAR CM ³	LOGARITHME	NOMBRE DE BIPARTITIONS	TEMPS DE GÉNÉRATION
0 h.	50 000 000	7,69897		
1 h.	63 500 000	7,80277	0,345	176 m.
2 h.	85 500 000	7,93197	0,429	139 m.
3 h.	140 000 000	8,14613	0,711	84 m.
4 h.	235 000 000	8,37107	0,747	80 m.
5 h.	355 000 000	8,55023	0,595	100 m.
6 h.	550 000 000	8,74036	0,598	100 m.
7 h.	825 000 000	8,91645	0,581	103 m.
8 h.	1 200 000 000	9,07918	0,540	111 m.
9 h.	1 326 000 000	9,12254	0,144	416 m.
10 h.	1 416 000 000	9,15106	0,093	645 m.
11 h.	1 446 000 000	9,16017		
12 h.	1 452 000 000	9,16197		

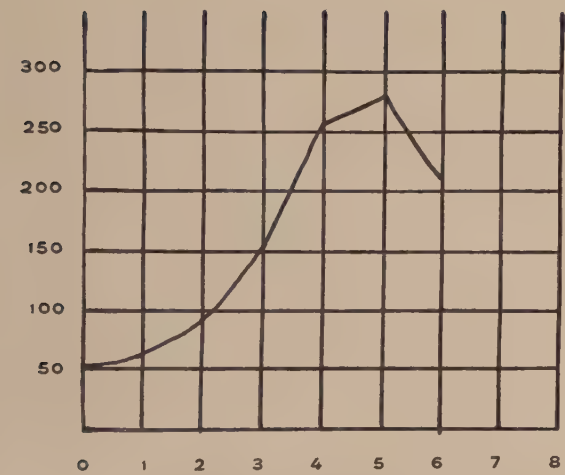
40°	NOMBRE DE COCCI PAR CM ³	LOGARITHME	NOMBRE DE BIPARTITIONS	TEMPS DE GÉNÉRATION
—	—	—	—	—
0 h.	50 000 000	7,69897		
1 h.	62 500 000	7,79588	0,321	187 m.
2 h.	88 000 000	7,94448	0,497	121 m.
3 h.	145 500 000	8,16286	0,725	82 m.
4 h.	265 000 000	8,42406	0,867	69 m.
5 h.	280 000 000	8,44716		
6 h.	208 000 000	8,31806		
7 h.				
8 h.				
41°	NOMBRE DE COCCI PAR CM ³	LOGARITHME	NOMBRE DE BIPARTITIONS	TEMPS DE GÉNÉRATION
—	—	—	—	—
0 h.	50 000 000	7,69897		
1 h.	61 000 000	7,78533	0,286	213 m.
2 h.	86 000 000	7,93450	0,495	121 m.
3 h.	135 000 000	8,13033	0,650	92 m.
4 h.	240 000 000	8,38021	0,830	72 m.
5 h.	255 000 000	8,40654		
6 h.	191 000 000	8,28103		
7 h.				
8 h.				
42°	NOMBRE DE COCCI PAR CM ³	LOGARITHME	NOMBRE DE BIPARTITIONS	TEMPS DE GÉNÉRATION
—	—	—	—	—
0 h.	50 000 000	7,69897		
1 h.	60 000 000	7,77815	0,263	228 m.
2 h.	82 000 000	7,91381	0,450	133 m.
3 h.	130 000 000	8,11394	0,664	90 m.
4 h.	220 000 000	8,34242	0,758	79 m.
5 h.	210 000 000	8,32222		
6 h.	151 500 000	8,18041		
7 h.				
8 h.				

43°	NOMBRE DE COCCI PAR CM ³	LOGARITHME	NOMBRE DE BIPARTITIONS	TEMPS DE GÉNÉRATION
—	—	—	—	—
0 h.	50 000 000	$\bar{7},69897$		
1 h.	58 000 000	$\bar{7},76343$	0,214	280 m.
2 h.	76 000 000	$\bar{7},88081$	0,389	154 m.
3 h.	125 000 000	$\bar{8},09691$	0,717	83 m.
4 h.	175 000 000	$\bar{8},24304$	0,485	123 m.
5 h.	160 000 000	$\bar{8},20412$		
6 h.	117 000 000	$\bar{8},06819$		
7 h.				
8 h.				
44°	NOMBRE DE COCCI PAR CM ³	LOGARITHME	NOMBRE DE BIPARTITIONS	TEMPS DE GÉNÉRATION
—	—	—	—	—
0 h.	50 000 000	$\bar{7},69897$		
1 h.	56 000 000	$\bar{7},74819$	0,163	368 m.
2 h.	71 000 000	$\bar{7},85126$	0,342	175 m.
3 h.	120 000 000	$\bar{8},07918$	0,758	79 m.
4 h.	138 500 000	$\bar{8},14145$		
5 h.	102 000 000	$\bar{8},00860$		
6 h.				
7 h.				
8 h.				
45°	NOMBRE DE COCCI PAR CM ³	LOGARITHME	NOMBRE DE BIPARTITIONS	TEMPS DE GÉNÉRATION
—	—	—	—	—
0 h.	50 000 000	$\bar{7},69897$		
1 h.	54 500 000	$\bar{7},73640$	0,124	483 m.
2 h.	64 500 000	$\bar{7},80956$	0,243	246 m.
3 h.	82 500 000	$\bar{7},91645$		
4 h.	61 000 000	$\bar{7},78533$		

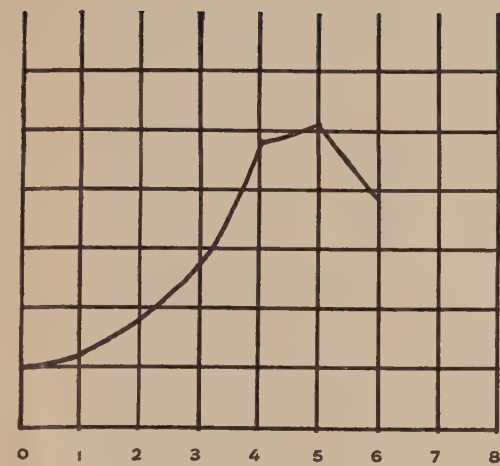




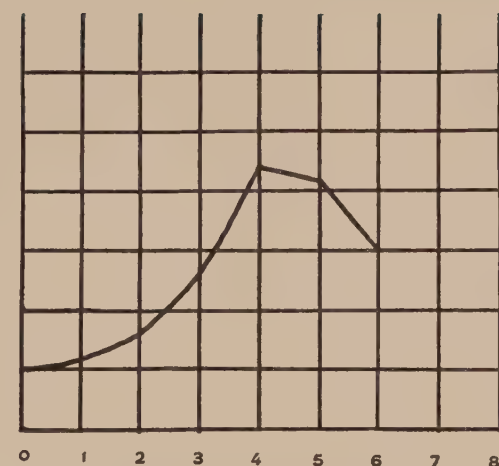




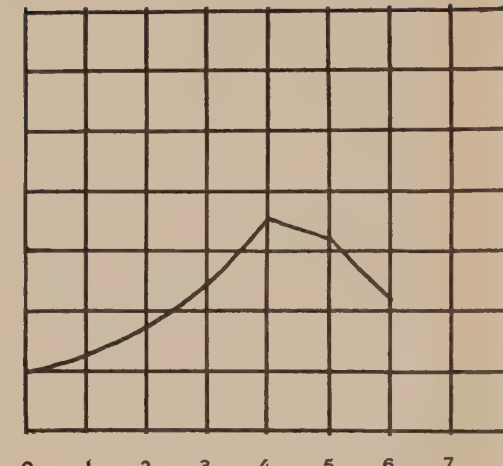
Multiplication du Staphylocoque à 40°.



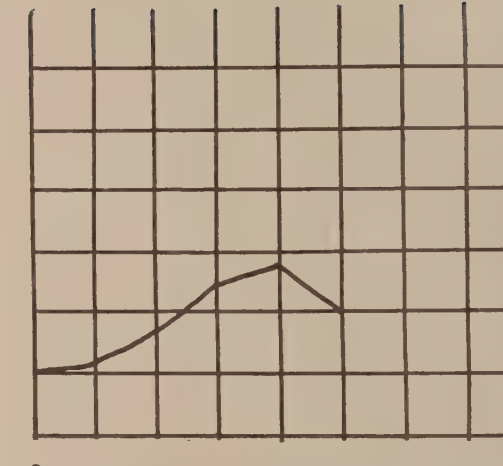
Multiplication du Staphylocoque à 41°.



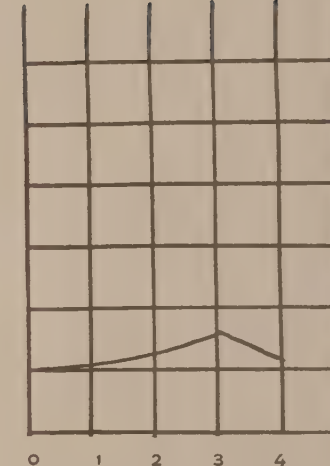
Multiplication du Staphylocoque à 42°.



Multiplication du Staphylocoque à 43°.



Multiplication du Staphylocoque à 44°.



Multiplication du Staphylocoque à 45°.

CHAPITRE III

DIFFÉRENTES ÉTUDES SUR LA MORPHOLOGIE

Les microbes présentent certaines variations morphologiques provenant du milieu, de l'âge, de la température; mais on ne sait quelles sont les limites exactes entre lesquelles peut se manifester le polymorphisme.

GUIGNARD et CHARRIN (49) étudièrent les variations morphologiques du Bacille Pyocyanique sous l'influence des antiseptiques.

Ils montrent d'abord qu'à la température de 35° le Bacille Pyocyanique peut donner une condensation des bacilles, des cellules enkystées, des arthrospores, susceptibles de redonner des bacilles lorsqu'elles sont remises dans des conditions normales.

GUIGNARD et CHARRIN obtiennent : des bacilles de toutes longueurs isolés ou associés, en pseudo-filaments ou en filaments, sous l'action du naphтол β (0^{gr}, 20 à 0^{gr}, 25 pour 1 000), du thymol (0^{gr}, 50 à 0^{gr}, 60 pour 1 000), de l'alcool (40 centimètres cubes pour 1 000); des filaments, sous l'action du bichromate de potasse (0^{gr}, 10 à 0^{gr}, 15 pour 1 000); des bacilles incurvés formant des boucles et des spirilles à

spires très serrées, sous l'action de l'acide borique (6 à 7 pour 1 000). La créosote (0^{gr},75 à 1 gramme pour 1 000), le naphтол (0^{gr},20 à 0^{gr},30 pour 1 000), l'acide salicylique (1^{gr},50 à 2 grammes pour 1 000) donnent des cellules sphériques qui seraient des formes de conservation. Réensemencées en bouillon, elles redonnent des bacilles normaux.

GUIGNARD et CHARRIN estiment que les résultats peuvent être quelque peu influencés par de faibles différences dans la nature du milieu, l'âge, la vitalité de la culture et la quantité de semence.

A leur avis, ces modifications morphologiques n'ébranlent en rien la notion généralement admise de l'espèce, mais elles doivent attirer l'attention sur l'influence du milieu et des antiseptiques et mettre en garde contre la tendance à multiplier les espèces en se fondant sur des données morphologiques insuffisantes.

GASTON BONNIER (78) observe l'influence de la sursalure sur les bactéries marines, Il étudie les dix espèces suivantes :

- Bacillus arbusculus,
- inodorus,
- glycogenophilis,
- Clavaudi,
- piger,
- ruber-bruneus,
- pellicullus,
- Charentei,
- filamentosus,
- rosaceus niger.

Il a constaté que ces espèces peuvent supporter jusqu'à 8

à 16 pour 100 de sel marin et d'autre part se contenter de 0,3 à 0,2 du même sel.

GASTON BONNIER montre que les bactéries marines subissent des modifications morphologiques sous l'influence de la sursalure. Il trouve toujours une grande quantité d'éléments normaux et, à côté, des éléments déformés. Il obtient ainsi des bacilles associés en longues chaînes, des bâtonnets allongés, de 4 à 10 fois leur longueur habituelle, des formes filamenteuses spirillées ou immobiles, des formes droites ou incurvées, mobiles, des formes spiralées mobiles rappelant de vrais spirilles. Dans tous les cas, il y a un retard marqué dans le développement.

CLARK et RUEHL, 1919, ont fait une étude sur 70 souches bactériennes dans des milieux normaux, et ont examiné la morphologie aux diverses phases de la multiplication. Ils ont constaté des différences morphologiques très importantes entre les organismes âgés et les organismes jeunes. Les bactéries trouvées au bout de 4 à 9 heures sont beaucoup plus grandes que celles de 24 heures. La période où l'on trouve les organismes les plus grands correspond à la division cellulaire la plus active.

HENRICI, (55, 56, 57, 58, 59, 60) en 1921, 1922, 1923, 1924, 1925 a confirmé les résultats de Clark et Ruehl. Il a montré que les cultures atteignent leur grandeur maxima pendant la période logarithmique. Elles diminuent après cette phase jusqu'au maximum stationnaire ; et ensuite, pendant la période de destruction, présentent des formes d'involution.

M^{me} KAPLAN (63) en 1931 étudia la multiplication microbienne sur le Bacille Pyocyanique, elle constata que la

morphologie de ce bacille variait au cours du développement. Pendant la période de déclin, les formes anormales abondent et il devient presque impossible de faire les numérations. Les formes d'involution sont très nombreuses. M^{me} KAPLAN observe des variations morphologiques très grandes, mais variables. Elle retrouve toutes les formes d'involution décrites par Guignard et Charrin quand il s'agissait de l'action des antiseptiques.

En 1934 et 1935, DIMITRIEFF, SOUTEEFF et M^{lle} FIROUKOVA (32) étudièrent les phénomènes de lyse sur des cultures d'*Actinomyces bovis* Boestrœm. Ils partirent de colonies lysées qu'ils cultivèrent sur plaques de gélose. Ils obtinrent dans ces conditions deux sortes de colonies présentant des différences morphologiques. En outre, les premières, aptes à se lyser, digèrent le sérum de cheval coagulé, hémolysent la gélose au sang, et acidifient le lait tournesolé, tandis que les deuxièmes, inaptés à se lyser, ne digèrent pas le sérum de cheval coagulé, sont dépourvues de pouvoir hémolytique, et alcalinisent le lait tournesolé.

Les phénomènes de lyse se reproduisent de façon régulière et, parfois, dès le début de la croissance, certaines colonies se lysent. Il sembla à ces auteurs que la lyse pouvait être un phénomène transmissible. Ils parvinrent à obtenir des plaques stériles sur une culture en lui ajoutant un filtrat de cultures lysées. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus avec les bactéries.

Les filtrats de ces cultures lysées sont doués de propriétés antigènes. En immunisant des lapins, DIMITRIEFF, SOUTEEFF et M^{lle} FIROUKOVA obtinrent des sérums précipitants et fixateurs de l'alexine.

Le sang des malades atteints d'actinomyose fixe aussi dans la plupart des cas l'alexine avec le filtrat employé comme antigène.

Ils obtinrent quelques résultats thérapeutiques encourageants, en pratiquant des injections intradermiques ou intramusculaires des filtrats de cultures lysées à des malades atteints d'actinomyose.

ÉTUDE MORPHOLOGIQUE DU STAPHYLOCOQUE ET DU STREPTOCOQUE

Quand on cultive du Staphylocoque ou du Streptocoque sur un bouillon ordinaire de pH 7,4 à la température de 37° ou à une température inférieure, ils se reproduisent sous forme de cocci. Quand on les cultive dans des conditions anormales on observe des déformations.

Ces conditions anormales dysgénésiques peuvent être d'origines diverses : action de la chaleur, du pH , des antiseptiques ou du Bactériophage.

Les cocci présentent alors des formes d'involution variées que l'on peut grouper en deux catégories : les formes géantes et les formes bacillaires ou filamenteuses.

Les formes géantes apparaissent généralement au début de l'action dysgénésique et durent un temps assez court. Leur taille est variable. Certains cocci géants atteignent la grandeur des cellules de levures de boulangerie, quelquefois même ils sont plus volumineux encore.

Ces cellules géantes peuvent être groupées par deux. Quand une seule des cellules est développée, elles si-

mulent une cellule bourgeonnante. Quand les deux cellules sont également développées, elles ressemblent à un gros diplocoque.

Parfois une cellule géante s'observe à l'extrémité d'une chaînette de 3 ou 4 cocci de taille normale. D'autres fois enfin, parmi les cellules géantes isolées, on en trouve dont le centre est évidé; elles forment alors un anneau qui semble dû à un début de lyse.

A côté des formes géantes, on trouve des formes bacillaires et filamenteuses qui présentent d'ailleurs une série d'intermédiaires à partir de la forme coccus. On trouve des cocci associés par deux ou par trois, certains bien séparés, d'autres où la zone de séparation n'existe presque plus, ne laissant apercevoir qu'un rétrécissement médian. D'autres présentent la forme bacillaire avec une zone claire au milieu et deux points ronds plus foncés aux deux extrémités. D'autres enfin ont la forme nettement bacillaire.

Ces bacilles peuvent être isolés, et de grandeur variable ou être associés en chaînettes. Parfois les chaînettes renferment en même temps des cocci, des formes coccobacillaires et des formes bacillaires. Enfin on trouve des filaments assez minces et longs intercalés entre des cocci.

Action de la chaleur.

La chaleur influe sur le développement et la morphologie des cocci. Lorsque l'on chauffe à une température dysgénésique une émulsion de Staphylocoque, on constate au bout d'un certain nombre d'heures, variable avec la température, la présence de formes géantes, qui appa-

raissent de façon régulière et qui empêchent toute numération bactérienne à l'aide des levures. Ces formes apparaissent à la 7^e heure à 40°, 41°, 42°, 43° ; à partir de la 6^e heure à 44° et à partir de la 5^e heure à 45°. Parfois à ces températures, il apparaît des formes bacillaires mélangées aux formes géantes.

Une autre expérience a été faite sur l'influence de la chaleur. On part d'un tube de bouillon ordinaireensemencé avec du Staphylocoque de façon massive. Ce tube est plongé 3 minutes dans l'eau bouillante. A l'aide d'un tube témoin on voit que la température à l'intérieur du tube à la fin de l'essai est de 96°.

A ce moment il n'y a aucune déformation.

Ce même tube est ensuite placé pendant 1 heure à 24°, puis pendant 1 heure à la glacière. A la sortie de la glacière, commencent à apparaître les formes géantes.

Le tube est ensuite porté à l'étuve à 37°.

Au bout de deux heures les formes géantes sont plus volumineuses. La culture est laissée à 37° pendant deux jours. On constate la présence de bâtonnets courts et larges à côté de cocci et de formes plus ou moins lysées ; les formes géantes ont disparu.

Après 7 jours d'étuve à 37°, il ne reste plus que des cocci et des formes lysées.

Action du pH.

Lorsque l'on s'écarte de la neutralité, le Staphylocoque et le Streptocoque donnent des formes d'involution.

I. pH 6,6-6,8. — On place à l'étuve à 37° un tube de

Staphylocoque et un de Streptocoque, tous deux ensemen-
cés dans du bouillon de pH 6,6-6,8.

Au bout de 3 jours, on observe dans le tube de Staphy-
locoque des cocci et des formes bacillaires isolées et dans
le tube de Streptocoque, des cocci, des formes bacillaires
isolées et des formes bacillaires intercalées dans les chaî-
nettes.

Par réensemencement en bouillon normal ces formes
disparaissent.

II. pH 8,4. — Au bout de 17 heures, le Staphylocoque
fournit des cocci et de nombreuses formes géantes.

Au bout de 24 heures, on observe des cocci et de très
rares filaments, les formes géantes disparaissent.

Au bout de 7 jours les formes d'involution ont disparu,
il ne reste plus que des cocci.

Action des antiseptiques.

Les antiseptiques agissent sur le développement des
microbes et sur leur morphologie :

Fluorure d'argent.

On place à l'étuve à 37°, 3 tubes ensemen-
cés avec du Staphylocoque sur du bouillon renfermant : 1° $\frac{1}{50\,000}$ de
fluorure d'argent; 2° $\frac{1}{25\,000}$ de fluorure d'argent; 3° $\frac{1}{16\,600}$
de fluorure d'argent.

Au bout de 3 jours, on observe dans les 3 tubes des

cocci, des chaînettes de streptobacilles pouvant renfermer jusqu'à 6 à 7 éléments, et des formes lysées dans le 2^e et dans le 3^e tube. Au bout de 5 jours ces cultures sont entièrement lysées.

Une autre expérience est faite de la façon suivante. On met 5 gouttes d'un bouillon de Staphylocoque cultivé pendant 3 jours à l'étuve à 37° dans 5 centimètres cubes d'un bouillon renfermant 5 pour 100 de fluorure d'argent. On réensemence avec une anse de platine dans du bouillon normal après 1 minute, 2 minutes, 3 minutes de contact. Ces trois tubes sont placés à l'étuve à 37°.

Après 3 jours on observe dans les 2 premiers tubes des cocci et des chaînettes de bacilles pouvant atteindre 6 à 7 éléments. Le 3^e tube est entièrement lysé.

Au bout de 5 jours la lyse a gagné tous les tubes.

Chlorure de sodium.

On fait une série de 10 tubes ensemencés avec du Staphylocoque sur du bouillon renfermant : 1^o 0^{gr},30, 2^o 0^{gr},60, 3^o 0^{gr},90, 4^o 1^{gr},20, 5^o 1^{gr},50, 6^o 1^{gr},80, 7^o 2^{gr},10, 8^o 2^{gr},40, 9^o 2^{gr},70, 10^o 3 grammes de chlorure de sodium.

On les place à l'étuve à 37°. On observe après 3 jours :

Un trouble dans les 5 premiers tubes.

Un voile dans les 2 premiers.

Des cocci dans les 7 premiers.

Des cocci géants dans le 5^e, le 6^e et le 7^e.

Des formes bacillaires dans le 6^e et le 7^e.

Le 8^e, le 9^e et le 10^e ne renferment que des formes lysées.

Au bout de 7 jours toutes les formes d'involution ont disparu.

Soit en résumé :

TUBE	ClNa	TROUBLE	VOILE	COCCI	COCCI GÉANTS	BACILLES	LYSE
—	—	—	—	—	—	—	—
1	0 ^{gr} ,30	+	+	+	—	—	—
2	0 ^{gr} ,60	+	+	+	—	—	—
3	0 ^{gr} ,90	+	—	+	—	—	—
4	1 ^{gr} ,20	+	—	+	—	—	—
5	1 ^{gr} ,50	+	—	+	+	—	—
6	1 ^{gr} ,80	—	—	+	+	+	+
7	2 ^{gr} ,10	—	—	+	+	—	+
8	2 ^{gr} ,40	—	—	—	—	—	+
9	2 ^{gr} ,70	—	—	—	—	—	+
10	3 ^{gr}	—	—	—	—	—	+

Le Streptocoque placé dans les mêmes conditions fournit un trouble dans les 2 premiers tubes, des cocci dans les 2 premiers, et des bacilles dans le 2^e. Au bout de 7 jours les formes d'involution ont disparu.

Soit en résumé :

TUBE	ClNa	TROUBLE	COCCI	BACILLES	LYSE
—	—	—	—	—	—
1	0 ^{gr} ,30	+	+	—	—
2	0 ^{gr} ,60	+	+	+	—
3	0 ^{gr} ,90	—	—	—	+
4	1 ^{gr} ,20	—	—	—	+

Une autre série d'expériences a été réalisée sur du Staphylocoque cultivé sur du bouillon normal de pH 7,4 additionnée de 20 pour 100 de chlorure de sodium, de 0,28 pour 1000 d'acide borique et de 0,60 pour 1000 de thymol.

On prépare un tube de ce milieu, un deuxième tube de ce milieu dilué au 1/2 avec du bouillon normal, et un troi-

sième tube de ce milieu dilué au 1/3 avec du bouillon normal.

Après 17 heures d'étuve à 37° on observe :

Dans le premier tube des cocci et des formes lysées.

Dans le deuxième, des cocci, des bacilles et des formes lysées.

Dans le troisième, les formes bacillaires n'apparaissent qu'au bout de 24 heures.

Au bout de 3 jours, les formes d'involution ont disparu. Il reste des cocci et des formes lysées.

Soit en résumé :

TUBE	TROUBLE	COCCI	BACILLES	LYSE
—	—	—	—	—
1 après 17 h.	+	+	—	+
2 après 17 h.	+	+	+	+
3 après 24 h.	+	+	++	+

Bichromate de potassium.

Cet essai porte sur du Streptocoque et un bouillon de pH 6,8-6,9 renfermant 0^{gr},15 pour 1 000 de bichromate de potassium.

On place à l'étuve à 37°. Les cocci subsistent durant toute la durée de l'expérience.

Au bout de 17 heures apparaissent des bacilles intercalés dans les chaînettes de cocci.

Au bout de 20 heures apparaissent en outre des chaînettes ne renfermant que des bacilles.

Au bout de 3 jours on trouve en plus des bacilles isolés.

Par réensemencement sur bouillon normal, les formes d'involution disparaissent.

Asparagine.

On prépare 4 milieux à l'asparagine.

Le premier renferme tous les éléments normaux ; le deuxième comporte la même formule, moins la glycérine ; le troisième est sans glucose ; le quatrième est sans glucose ni glycérine.

- 1) Glucose. 1 gramme.
 Peptone bactériologique Byla. 20 —
 Glycérine. 50 —
 Soude au 1/3. 2^{cm3},4.
 Asparagine. 1 gramme.
 Eau, q. s. p. 1 000 centimètres cubes.
- 2) Glucose. 1 gramme.
 Peptone Byla. 20 —
 Soude au 1/3. 2^{cm3},4.
 Asparagine. 1 gramme.
 Eau, q. s. p. 1 000 centimètres cubes.
- 3) Peptone Byla. 20 grammes.
 Glycérine. 50 —
 Soude au 1/3. 2^{cm3},4.
 Asparagine. 1 gramme.
 Eau, q. s. p. 1 000 centimètres cubes.
- 4) Peptone Byla. 20 grammes.
 Soude au 1/3. 2^{cm3},4.
 Asparagine. 1 gramme.
 Eau, q. s. p. 1 000 centimètres cubes.

Ces quatre milieux sontensemencés avec du Staphy-

locoque et du Streptocoque et placés à l'étuve à 37°.

Après 3 jours, seuls les tubes renfermant du Staphylocoque ont fourni une culture.

Dans les milieux 1) et 3) renfermant de la glycérine on trouve des filaments joignant les cocci.

Après 5 jours, tous les tubes se sont développés et on trouve dans tous de minces filaments peu nombreux.

Après 12 jours, tous ces filaments ont disparu.

Alcool.

On fait une série d'essais avec de l'alcool et du Staphylocoque. On ensemence ce dernier dans 4 tubes de bouillon renfermant pour 10 centimètres cubes : 1° 1/2 centimètre cube ; 2° 1 centimètre cube ; 3° 1 centimètre cube et demi ; 4° 2 centimètres cubes d'alcool à 95° ; et on les place à l'étuve à 37°.

Au bout de 3 jours, seule la première culture a fourni un trouble. Néanmoins, dans les 2 premiers tubes, on trouve des cocci et des formes géantes ; les 2 autres sont lysés.

Au bout de 7 jours, toutes les cultures sont lysées.

Action du Bactériophage.

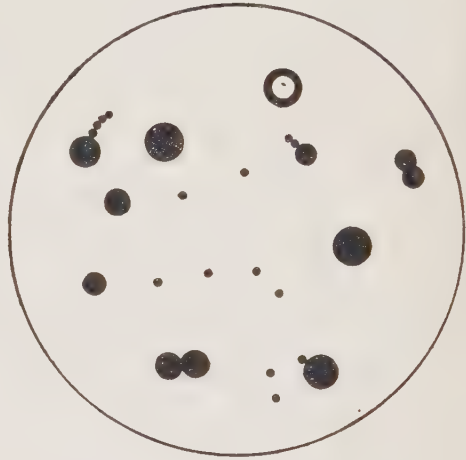
Le Bactériophage agit sur les microbes en les lysant, mais avant de les détruire, il les déforme. On a pris pour vérifier ce fait un tube de Staphylocoque dans lequel on a ajouté 2 gouttes d'un bouillon renfermant du Bactériophage. On place le tube à l'étuve à 37°. Le lendemain on fait un

examen microscopique et on trouve des cocci, des formes lysées et de longs filaments dont certains présentent déjà un début de lyse.

Au bout de 3 jours, le tube est devenu limpide et on ne trouve plus que des formes lysées.



Évolution d'une culture de Staphylocoque vers la forme filamenteuse.



Évolution d'une culture de Staphylocoque vers la forme géante.

CONCLUSIONS

Les courbes présentées ci-avant montrent que la croissance du Staphylocoque se poursuit de façon régulière pendant les huit premières heures, aux températures échelonnées de 25° à 37°.

De 25° à 30°, l'action se continue de façon presque uniforme. Elle devient ensuite plus rapide de 31° à 37°. Au delà de 37°, la poussée se ralentit.

Le temps nécessaire pour qu'une culture soit conduite de l'ensemencement au maximum stationnaire diminue de 37° à 45°, pour devenir très court à cette dernière température.

Le nombre de cocci constituant le maximum stationnaire diminue très rapidement de 37° à 40° et plus lentement ensuite de 40° et 45°.

D'autre part nous avons montré que sous l'influence de diverses causes dysgénésiques : chaleur, antiseptiques (fluorure d'argent, chlorure de sodium, bichromate de potassium, alcool), asparagine, *pH*, Bactériophage, le Staphylocoque donne des formes d'involution qui sont de deux sortes : 1° les formes géantes, 2° les formes bacillaires et filamenteuses.

Ces formes semblent provenir d'une première modifi-

cation du groupement des cocci entre eux. En effet, au lieu de rencontrer des cocci associés en amas irréguliers comme dans les cultures normales de Staphylocoque, on rencontre constamment, précédant l'apparition des formes d'invololution, de nombreux cocci associés en diplocoques ou en chaînettes très courtes.

Les formes géantes ne semblent pas avoir été décrites jusqu'ici.

Elles peuvent atteindre 10 μ . de diamètre et présentent tous les intermédiaires entre ces formes extrêmes et les cocci normaux.

Les cocci géants peuvent être isolés ou accolés. On les trouve souvent associés avec un coccus normal. Ils simulent alors une levure bourgeonnante. Parfois une cellule géante se trouve à l'extrémité d'une chaînette de cocci normaux. Ces associations proviennent de diplocoques ou de chaînettes dont un seul élément s'est développé.

D'autres fois, on observe deux cellules géantes accolées, provenant du développement des deux cocci d'un diplocoque ; quelquefois aussi, on trouve des cellules géantes dont le centre est lysé et affectant dès lors une forme d'anneau.

Les formes bacillaires et filamenteuses proviennent de la soudure de plusieurs cocci.

On trouve ainsi des cocci simplement associés en diplocoques ; d'autres bacilliformes avec une zone centrale plus claire ; d'autres enfin nettement bacillaires et homogènes. Les formes bacillaires sont isolées ou groupées en chaînettes, ou incorporées dans des chaînettes de cocci.

Nous avons aussi rencontré des filaments pouvant

atteindre jusqu'à 70 μ de long sur 1 demi μ à 1 μ de large.

Avec le Streptocoque, les résultats sont identiques : formes géantes, bacillaires et filamenteuses semblables à celles décrites pour le Staphylocoque.

Ces transformations morphologiques des cocci sont intéressantes à noter, car elles représentent la contre-partie de celles que GUIGNARD et CHARRIN ont observées en amenant un organisme bacillaire (Bac. Pyocyanique) à affecter des formes coccus.

Vu :

Le Président de la Thèse,
L. LUTZ.

Vu :

Le Doyen de la Faculté
Paul GUÉRIN.

Vu ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABDERHALDEN (E). — Die Verwendung der Gewichtszu- und Abnahme automatischregistrierender Wage. *Fermentforschung*, 1915, t. 4, p. 155 et 229.
2. AVERY (O. T.), GLENN et CULLEN. — Hydrogen ion concentration of cultures of pneumococci of the different types in carbohydrate media. *Journ. of experim. Med.*, 1919, t. 30, p. 360.
3. BACHRACH (E. D.). — Accoutumance et anaphylaxie chez le bacille lactique. *Thèse Doct. ès sc.*, Paris, 1924.
4. BARBER. — The rate of multiplication of *Bacillus coli* at different temperatures. *Journ. of inf. Diseases*, 1908, t. 5, p. 379.
5. BIERNACKI (E.). — Ueber die Eigenschaft der Antiseptica, die Alkoholgährung zu beschleunigen und über gewisse Abhängigkeit ihrer Kraft von der chemischen Baustruktur, der Fermentmenge und der Vereinigung miteinander. *Pflüger's Arch.*, 1891, t. 49 p. 112
6. BOLAND. — *Inaug. Dissert.*, Amsterdam, 1902.
7. BONNIER (GASTON). — Sur la résistance à la sursalure des bactéries marines. *C. R. Ac. Sc.*, 6 avril 1915, t. 160 p. 443-445.
8. BONNIER (GASTON). — De l'action morphogénique de la sursalure sur les bactéries marines. *C. R. Ac. Sc.*, 3 mai 1915, t. 160, p. 608-610.
9. BRUNNER (G.) et ZAWADZKI (A.). — Zählplatte zu den Petri'schen Schalen. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1893, t. 14, p. 616.
10. BRUÈRE (H. P.). — *Jnal. Ph. Ch.*, 1926, S. 3, t. III, p. 37.
11. BRUÈRE (H. P.). — *Jnal. Ph. Ch.*, 1926, Série 3, t. IV, p. 241.
12. BUCHANAN (R. E.). — Life phases in bacterial cultures. *Journ. of inf. Diseases*, 1918, t. 23, p. 109.
13. BUCHANAN (R. E.). — Growth curves of bacteria. *In the Newer*

- Knowledge of Bacteriology and Immunology* de JORDAN (E. Ö.) et FALK (I. S.), chapitre v, p. 46.
14. BUCHANAN (R. E.) et FULMER (E. J.). — *Physiology and Biochemistry of Bacteria*, 1 vol., Baillière, Tindall and Cox, London, 1928.
15. BUCHANAN (R. E.) et FULMER (E. J.). — Growth phases and growth rates in cultures of microorganisms, in *Physiology and Biochemistry of Bacteria*, chapitre II, p. 4.
16. BÜCHNER (H.), LONGARD (K.) et RIEDLIN (G.). — Über die Vermehrungsgeschwindigkeit der Bakterien. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1887, t. 2, p. 1-6.
17. BURGESS (K. E.). — The toxicity towards staphylococcus of dilute phenol solutions containing sodium benzoate. *Journ. of Phys. Chem.*, 1920, t. 24, p. 738.
18. CARDOT (CH.) et CARDOT (H.). — Analogie entre les ferments lactiques et les Streptocoques au point de vue de l'action des antiseptiques. *C. R. Ac. Sc.*, 1917, t. 165, p. 272.
19. CARLSON (T.). — Über Geschwindigkeit und Grösze der Hefevermehrung in Würze. *Biochem Ztschr.*, 1913, t. 57, p. 313.
20. CHESNEY (ALAN M.). — The latent period in the growth of bacteria. *Journ. of experim. Med.*, 1916, t. 24, p. 287.
21. CHICK (MISS H.). — The bactericidal properties of blood serum. *Journ. of Hygiene*, 1912, t. 12, p. 414.
22. CLARCK (P. F.). — Morphological Changes during the Growth of Bacteria in *New. Knowledge of Bact. and Im.* de JORDAN et FALK, chapitre IV, p. 38.
23. CLARCK (P. F.) et RUEHL (W. H.). — Morphological changes during the growth of bacteria. *Journ. of Bact.*, 1919, t. 4, p. 615.
24. CLAYTON LANE (JANET E.). — Multiplication of bacteria and the influence of temperature and some other conditions. *Journ. of Hygiene*, 1909, t. 9, p. 239.
25. COHEN (BARNETT) et CLARCK (MANSFIELD). — The growth of certain bacteria in media of different hydrogen ion concentrations. *Journ. of Bact.*, 1919, t. 4, p. 409.
26. COPLANS (MYER). — Influences affecting the growth of microorganisms. Latency. Inhibition. Mass action. *Journ. of Pathology and Bact.*, 1910, t. 14, p. 1.
27. CRAMER (W.). — *Die Wasserversorgung von Zürich und ihr*

Zusammenhang mit der Typhusepidemie des Jahres 1884, Zurich, 1885.

28. DAVID (R.). — Contribution à l'étude numérique de la multiplication du Bacille Pyocyane dans différents milieux de culture liquides. *Thèse Doct. ès sc.*, Paris, 1931.
29. DAVISON. — *Journ. Amer. Med. Ass.*, 1916, t. 66, p. 1297.
30. DERNBY et AVERY. — The optimum hydrogen ion concentration for the growth of *Pneumococcus*. *Journ. of experim. Med.*, 1918, t. 18, p. 345.
31. DERNBY (K. G.). — La concentration optima en ions hydrogène favorisant le développement de certains micro-organismes. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1921, t. 35, p. 277.
32. DIMITRIEFF, SAUTIEFF et M^{lle} FIRIOUKOWA. — *Ann. de l'Inst. Past.*, avril 1936, p. 470.
33. DREYER, DUNCAN et GARDNER. — A general method of estimating the relative turbidity or opacity of fluid suspension including bacterial emulsions. *Biochem. Journ.*, 1916, t. 10, n° 3, p. 399.
34. DREYER (G.). — A simple procedure for the accurate numeration of blood cells and bacteria, without the use of a counting chamber. *The Lancet*, 29 janvier 1921, t. 200, p. 219.
35. EFFRONT (J.). — Influence de la constance du milieu sur le développement et le travail chimique des microorganismes. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, t. 91, p. 1175.
36. ELJKMANN (C.). — Über thermolabile Stoffwechselprodukte als Ursache der natürlichen Wachstumshehmung der Mikroorganismen. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, Originale, 1904, t. 37, p. 436.
37. FOKKER (A.-P.). — *Ztschr. für Hygiene und Infektionskrankh.*, 1890, t. 9, p. 41 (d'après Winslow).
38. FRAZER (C.-G.). — Methylene-blue as indicator in determining the toxicity of phenol and phenol-salt solutions towards yeast. *Journ. of Phys. Chem.*, 1921, t. 25, p. 1.
39. FRIES. — Eine einfache Methode zur genauen Bestimmung der Bakterienmengen in Bakteriensuspensionen. *Centralblatt für Bakt.*, Originale, 1921, t. 86, p. 90.
40. FÜLLER (G.-W.). — *Ann. Rep. State Board of Health of Massachusetts for 1894, 1895*, t. 26, p. 461 (d'après Winslow).
41. FULMER (E.-I.). — The effect of alcohol an the toxicity of

- phenol towards yeast. *Journ. of Phys. Chem.*, 1921, t. 25, p. 10.
42. FULMER (E.-I.). — The acclimatization of yeast to ammonium fluorid and its reversion in wort. *Journ. of Phys. Chem.*, 1921, t. 25, p. 455.
43. GATES (Fr.). — The effect of carbon dioxide in the cultivation of the meningococcus. *Journ. of experim. Med.*, 1919, t. 29, p. 321.
44. GATES (Fr.). — A method of standardizing bacterial suspensions. *Journ. of experim. Med.*, 1920, t. 31, p. 105.
45. GESTEAU. — Établissement d'un système thermostatique rationnel. Applications pratiques. *Thèse de pharmacien supérieur*, 1934.
46. GLYNN (E.), POWELL (M.), REES (A.-A.) et COX (G.-L.). — Observations upon the standardisation of bacterial vaccines by the Wright, the kœmocyto-meter and the plate culture methods. *Journ. of Pathology and Bact.*, 1913-1914, t. 18, p. 379.
47. GOSIO. — *Boll della. R. Acc. Med. di Roma*, 1917, t. 42, p. 3-4 (d'après F. Vlès).
48. GOTSCHLICH et WEIGANG. — Über die Beziehung zwischen Virulenz und Individuenzahl einer Cholerakultur. *Ztschr. für Hygiene*, 1895, t. 20, p. 376.
49. GUIGNARD et CHARRIN. — Sur les variations morphologiques du Bacille Pyocyannique. *C. R. Ac. Sc.*, 1889, t. 105, p. 1192.
50. HARVEY. — The tinturometer. *Ind. Journ. Med. Res.*, 1919, t. 7, p. 346-352.
51. HECKSCHER (Hans). — Méthode pour la numération microscopique des bactéries. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, t. 84, p. 1039.
52. HECKSCHER (Hans). — Détermination néphélométrique des émulsions bactériennes. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, t. 85, p. 378.
53. HECKSCHER (Hans). — Nouvelle méthode pour la numération des bacilles vivants contenus dans une émulsion. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, t. 85, p. 612.
54. HEHEVERTH (F.-H.). — Die mikroskopische Zählungsmethode der Bakterien von Alex. Klein, und einige Anwendungen derselben. *Archiv. für Hygiene*, 1901, t. 39, p. 321.
55. HENRICI (A.-T.). — A statistical study of the form and growth of a spore bearing bacillus. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1921, t. 19, p. 132.
56. HENRICI (A.-T.). — Differential counting of living and dead

- cells of bacteria. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1923, t. 20, p. 293.
57. HENRICI (A.-T.). — A statistical study of the form and growth of *Bacterium coli*. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1923, t. 21, p. 215.
58. HENRICI (A.-T.). — Influence of age of parent culture on size of cells of *Bacillus megatherium*. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1924, t. 21, p. 343.
59. HENRICI (A.-T.). — Influence of concentration of nutriment on size of cells of *Bacillus megatherium*. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1924, t. 21, p. 345.
60. HENRICI (A.-T.). — *Morphologic variations and the rate of growth of bacteria*, 1 vol. 1928, p. 194, Baillière, Tindall et Cox, London.
61. HENRIQUES (O.-M.). — Technique de numération des bactéries. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, t. 88, p. 819.
62. HESSE (W.). — Über die gasförmigen Stoffwechselprodukte beim Wachstum der Bakterien. *Ztschr. für Hygiene*, 1893, t. 15, p. 17.
63. KAPLAN (M^{me}). — Influence du nombre des microbes ensemencés sur la multiplication du Bacille Pyocyanique dans un milieu de culture liquide. *Thèse Doct. Pharm.*, Paris, 1931.
64. KENDRICK (Mac) et PAÏ. — The rate of multiplication of micro-organisms. A mathematical study. *Proc. Roy. soc. Edinburg*, 1911, t. 21, p. 649 (d'après Graham Smith).
65. KLEBS. — *Archiv. für exp. Path. und Pharm.*, 1873, t. 1.
66. KLEIN (Alex.). — Eine neue mikroskopische Zählungsmethode der Bakterien. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1900, t. 27, p. 834.
67. KLEIN (Alex.). — Über die Dosierung der Schutzimpfstoffe. *Berlin. klin. Wochenschrift*, 10 avril 1916, p. 395-399.
68. LAFAR (Franz). — Eine neue Zählvorrichtung für Plattenkulturen in Petri'schalen. *Ztsch. für Nahrungsmitteluntersuchung-u. s. w.* Wien, 1893, n° 24, p. 429.
69. LEONE (C.). *Arch. für Hyg.*, 1886, t. 4, p. 168.
70. LUHRIG (H.) et SARTORI (A.). — Garungshemmungen zuckerhaltigen Lösungen durch Konservierungsmittel. *Pharm. Zentralblatt*, 1908, t. 49, p. 934.

71. MICHAELIS (L.) et MARCORA (F.). — Die Säureproduktivität des *Bacterium coli*. *Ztschr. für Immunitätsforschung und exp. Therapie*, 1912, t. 14, p. 170-173.
72. MIQUEL (P.). — Nouvelles recherches sur les poussières organisées de l'atmosphère. *Annuaire de l'observatoire de Montsouris*, 1880, t. 9, p. 386.
73. MIQUEL. — Instructions relatives à l'analyse micrographique des eaux. *Revue d'hygiène*, 1887, t. 9, p. 725.
74. MIQUEL. — *Manuel pratique d'analyse bactériologique des eaux*. 1 vol., Paris, Gauthier-Villars, 1891.
75. MIQUEL (P.) et GAMBIER (R.). — *Traité de bactériologie pure et appliquée à la médecine et à l'hygiène*. 1 vol., Paris, Naud, 1902.
76. MÜLLER (MAX.). — Über den Einfluss von Fiebertemperaturen auf die Wachstumsgeschwindigkeit und die Virulenz des Typhus Bacillus. *Ztschr. für Hygiene*, 1895, t. 20, p. 245.
77. NAEGELI et SCHWEDENER. — *Das Mikroskop*, 2^{te} Aufl., 1877, p. 640.
78. PAINE (SYDNEY). — The permeability of the yeast cell. *Proc. Roy. Soc. of London*, B. 1911-12, t. 84, p. 289-307.
79. PENFOLD (W. J.). — On the nature of bacterial lag. *Journ. of Hygiene*, 1914, t. 14, p. 215.
80. PENFOLD et NORRIS. — The relation of concentration of food supply to the generation time of Bacteria. *Journ. of Hygiene*, 1912, t. 12, p. 527.
81. PORCELLI-TITONE. — *Reforma medica*, t. 31, n° 42 (D'après F. Vlès).
82. RAHN (OTTO). — Über den Einfluss der Stoffwechsel-produkte auf das Wachstum der Bakterien. *Centralblatt für Bakt. und Par.* II Abt, 1906, t. 16, p. 417 et 609.
83. REGNARD (P.). — Appareil destiné à enregistrer sous forme de courbe continue les phénomènes de la fermentation. *C. R. S. Biol.*, 1882, t. 4, p. 459.
84. REGNIER (J.) et (L.) NEIPP. — *Bulletin des sciences pharmacologiques*, 1933, p. 233.
85. REGNIER (J.) et LAMBIN (S.). — Introduction à l'étude des antiseptiques. Etude numérique du croît du Bacille Pyocyanique dans un milieu de culture liquide. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1927, t. 34, p. 401 et 490.

86. RICHET (Ch.) et CARDOT (H.) — Influence d'élévations thermiques faibles et brèves sur la marche des fermentations. *C. R. Ac. Sc.*, 1916, t. 163, p. 954.
87. ROBERT (LÉOP.). — Diaphanomètre. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, t. 84, p. 820.
88. SABOURAUD. — *Méthode de Sabouraud pour la préparation des vaccins staphylococciques* (d'après Calmette, Nègre et Boquet, p. 531).
89. SCHULTZ (H.). — Ein apparat zur graphischen Darstellung von Gärungsvorgängen. *Pflügers Archiv. für d. ges. Phys.*, 1907, t. 120, p. 51.
90. SLATOR (A.). — The rate of fermentation by growing yeast cells. *Biochem. Journ.*, 1913, t. 7, p. 197.
91. SLATOR (A.). — A note on the lag phase in the growth of microorganisms. *Journ. Hygiène*, 1917, t. 16, p. 100.
92. SLATOR (A.). — Yeast crops and the factors which determine them. *Journ. of Chem. Soc.*, 1921, t. 119, p. 115.
93. SMITH (GRAHAM). — The behaviour of bacteria in fluid cultures as indicated by daily estimates of the numbers of living organisms. *Journ. of Hygiene*, 1920, t. 19, p. 133.
94. THONI (J.) et THAYSEN (A. C.). — Experimentelle Untersuchungen zur Feststellung der Mindestzahl von Bacillen, die beim Meerschweinchen noch Tuberkulose hervorruft. *Centralblatt für Bakt. und Par., Originale*, 1915-16, t. 77, p. 308.
95. TROESTER. — Verfahren Zum Zählen abgetöteter Bakterien in Aufschwemmungen. *Centralblatt für Bakt. Originale*, 1922, t. 88, p. 252.
96. VLÈS (F.). — Sur la signification des dosages bactériens. *C. R. Soc. Biol.*, 1919, t. 82, p. 373.
97. VLÈS (F.). — Recherches sur quelques propriétés optiques des suspensions biologiques et leur application à l'opacimétrie bactérienne. *Arch. de physique biologique*, 1921, t. 1, p. 189.
98. WHIPPLE (G. C.). — *Tech. Quart.*, 1901, t. 14, p. 21. (D'après WINSLOW).
99. WILSON (G. S.). — The proportion of viable bacteria in young cultures with especial reference to the technique employed in counting. *Journ. of Bact.*, 1922, t. 7, p. 405.
100. WINSLOW (G. E. A.). — The Rise and Fall of Bacterial Popu-

- lations in the *N. knowledge of bact. and im.*, de JORDAN et FALK, chap. VI, p. 58.
101. WINSLOW (C. E. A.) et BROOKE (OLIVE R.). — The viability of various species of bacteria in aqueous suspensions. *Journ. of Bact.*, 1927, t. 13, p. 235.
102. WRIGHT (A. E.). — *The Lancet*. London, 1902, t. 2, p. 11.
103. WRIGHT (A. E.). — *Technique of the Test and Capillary glass tube*. London, Constable and Co, 1912.
104. ZEISLER (J.). — Binokulares Plattenkulturmikroskop. *Centralblatt für Bakt. und Par., Originale*, 1922, t. 88, p. 430.
105. ZELIKOW (J.). — Quantitative Bestimmung der Bakterialmasse durch die Kolorimetrische Methode. *Centralblatt für Bakt. und Par., Originale*, 1906, t. 42, p. 570.
-

CHARTRES. — IMPRIMERIE DURAND, RUE FULBERT (6-1936).
